

# **Efeito da aplicação de diferentes doses de um extrato de algas em oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Cobrançosa’**

**Catarina Isabel Rola Garcia**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica – Hortofruticultura e Viticultura**

Orientador: Investigadora Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

**Júri:**

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogal: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Bolseira de Investigação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Cláudia Sofia Batalha Neto, Gestora de Marketing e Desenvolvimento da Selectis.

## **Agradecimentos**

À Dra. Eng. Mariana Mota, por toda a dedicação, carinho e apoio prestado na elaboração deste trabalho. Obrigada por todo o tempo despendido nas viagens a Santarém e por sempre estar disponível para prestar auxílio. A liberdade que sempre me deu na execução de trabalhos laboratoriais e ao longo destes dois anos, ajudou-me a crescer e a perceber que poderei sempre contar com a extraordinária pessoa que é.

Ao Arquiteto Henrique Santos Lima por ter disponibilizado o seu Olival para a realização dos ensaios.

Ao Eng. João Soares Lopes, pelo acompanhamento nas datas de colheita e por ter tornado possível a realização deste trabalho, tendo realizado as aplicações de campo.

Aos meus pais, que me proporcionaram chegar até aqui e que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, dando a motivação e energia para concretizar todas as minhas conquistas. A vocês devo tudo.

Aos meus colegas de curso, Rita, Hugo e João por toda a convivência e laços criados, e em especial à Catarina, pela verdadeira amizade e por ter sido a maior impulsionadora para acabar esta tese.

À Marta, Ana, Joana, Mariana e Carina pela amizade e por estarem sempre presentes na minha vida dando o grande incentivo para a conclusão deste trabalho.

Ao Rui Santos por todo o apoio e por todas as tardes em que me ajudou a preparar o material necessário para a recolha de amostras.

A todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para o meu sucesso, fica aqui registado o meu sincero agradecimento: Muito Obrigada!

## Resumo

O presente trabalho procurou estudar o efeito da aplicação foliar do bioestimulante Goëmar Olivos, da Selectis, na eficiência de utilização das formas de azoto (nitríca e amoniacal) em oliveiras das cultivares Arbequina e Cobrançosa. Esta avaliação foi feita de forma indirecta, pela quantificação das atividades enzimáticas da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em folhas e órgãos reprodutores de oliveira e pela quantificação do teor de clorofila presente nas folhas (relacionado com o teor de azoto nos tecidos), medido com o aparelho SPAD (*soil plant analysis development*). O ensaio de campo realizou-se na Quinta Vale de Lobos, em Santarém, em olival super-intensivo de Arbequina e Cobrançosa, tendo-se comparado duas modalidades de tratamento (modalidade simples: duas aplicações de 2,5l/ha cada, uma no fim do repouso, outra na plena floração; modalidade dupla: uma única aplicação de 5l/ha à plena floração) com uma testemunha (aplicação de água). Para as atividades enzimáticas, as amostras foliares e florais foram colhidas desde o período antecedente à plena floração até ao endurecimento do caroço. As medições com o SPAD foram efetuadas durante o mês de maio em folhas recém-expandidas das três modalidades. Os doseamentos enzimáticos e as avaliações do SPAD não apontaram, em nenhuma das cultivares, para um benefício claro decorrente da aplicação do bioestimulante. As determinações das atividades enzimáticas ao longo do tempo revelaram maiores picos na fase da plena floração e do endurecimento do caroço, alturas em que os órgãos reprodutores se constituem como *sinks* muito fortes. As leituras efetuadas com o SPAD nas folhas de ambas as cultivares não foram conclusivas, devido provavelmente à espessura das folhas e respetiva cor escura. Algumas oscilações observadas podem estar relacionadas com as variações térmicas, que condicionam a atividade metabólica nas plantas.

Palavras-chave: Nitrato redutase, Glutamina sintetase, *Olea europaea* L., SPAD, extrato de algas.

## Abstract

The present work aimed to study the effect of the application of biostimulant Goëmar Olivos, from Selectis, in the efficiency of use of nitrogen forms (nitrate and ammonium) in the olive cultivars Arbequina and Cobrançosa. This assessment was made indirectly by determination of enzymatic activities of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) in leaves and reproductive organs of the olive trees and the quantitation of chlorophyll content in the leaves (related to the nitrogen content) measured with the equipment SPAD (soil analysis plant development). The field trial was held in Quinta Vale de Lobos, in Santarém, in a hedgerow olive grove of Arbequina and Cobrançosa, and two treatments were compared (single dosis: two applications of 2.5l/ha each, according to the manufacturer's instructions, the first at the onset of development after winter, the other at full bloom; double dosis: a single application of 5l/ha at full bloom) with a control (water application). For enzyme activities, leaf and reproductive organ samples were taken from the period before full bloom to the hardening of the seed. Measurements with SPAD were made during May in newly expanded leaves of three treatments. Enzyme assays and SPAD assessments did not show, in any of the cultivars, a clear benefit deriving from the application of the biostimulant. The determination of enzyme activities over time revealed major peaks in full bloom and to the hardening of the seed, stages when the reproductive organs are constituted as strong sinks. SPAD measurements in the leaves of both cultivars were inconclusive, probably due to the difficulty inherent to the color of olive leaves. Some oscillations that were observed can be related to temperature variations, which affect the metabolic activity in plants.

Key-words: Nitrate reductase, Glutamine synthetase, *Olea europaea* L., SPAD, seaweed extract.

## Índice

1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	2
2.1. Produção e importância económica da cultura da oliveira .....	2
2.1.1. Produção mundial e importância económica .....	2
2.1.2. Produção em Portugal e importância económica .....	4
2.2. Características botânicas da oliveira .....	5
2.2.1. Estruturas vegetativas .....	6
2.2.1.1. Folha .....	6
2.2.1.2. Raiz .....	6
2.2.2. Estruturas reprodutivas .....	7
2.2.2.1. Inflorescência e flor .....	7
2.2.2.2. Fruto .....	7
2.2.3. Cultivares em Estudo .....	7
2.2.3.1. 'Arbequina' .....	7
2.2.3.2. 'Cobrançosa' .....	8
2.2.4. Ciclo biológico .....	9
2.2.5. Condições edafo-climáticas .....	13
2.2.5.1. Temperatura .....	13
2.2.5.2. Necessidades hídricas .....	14
2.2.5.3. Solo .....	15
2.3. Dinâmica do azoto (N) no sistema solo-planta .....	16
2.3.1. Azoto no solo .....	16
2.3.2. Absorção e circulação do N na planta .....	17
2.3.3. Azoto e a oliveira .....	21
2.3.4. Enzimas do metabolismo do azoto estudadas .....	22
2.3.4.1. Nitrato-redutase .....	22
2.3.4.2. Glutamina-sintetase .....	25
2.4. Utilização de um extrato de algas como bioestimulante .....	26
2.5. Importância da clorofila como indicador do teor de azoto na planta .....	29
2.5.1. Fotossíntese .....	29
2.5.2. Síntese de clorofila .....	30
2.5.3. Utilização do medidor de clorofila SPAD na oliveira .....	30

3.	Material e Métodos.....	33
3.1.	Local de ensaio.....	33
3.1.1.	Características climáticas.....	33
3.1.2.	Caraterísticas do solo.....	34
3.2.	Material vegetal .....	34
3.2.1.	Caracterização do material vegetal .....	34
3.2.2.	Evolução dos estados fenológicos.....	35
3.2.2.1.	‘Arbequina’ .....	35
3.2.2.2.	‘Cobrançosa’ .....	36
3.3.	Aplicação do Bioestimulante .....	38
3.4.	Ensaio enzimático .....	38
3.4.1.	Preparação do extrato de reação .....	38
3.4.2.	Quantificação proteica .....	39
3.4.3.	Quantificação enzimática.....	40
3.4.3.1.	Nitrato redutase .....	40
3.4.3.2.	Glutamina sintetase .....	41
3.5.	Medições do teor de clorofila.....	42
3.6.	Análise estatística .....	42
4.	Resultados e discussão.....	43
4.1.	Dados climáticos.....	43
4.2.	Determinação da atividade enzimática da NR e GS nas folas e órgãos reprodutores de ‘Arbequina’ e ‘Cobrançosa’ .....	46
4.2.1.	‘Arbequina’ .....	47
4.2.2.	‘Cobrançosa’ .....	52
4.3.	SPAD.....	57
5.	Conclusões .....	63
6.	Bibliografia .....	65
7.	Anexos .....	69

## Lista de quadros

<b>Quadro 1</b> - Datas de colheita de amostras e respectivos estados fenológicos da cultivar Arbequina. Escala de BBCH (adaptada de Sanz-Cortés <i>et al.</i> , 2002).....	35
<b>Quadro 2</b> - Datas de colheita de amostras e respectivos estados fenológicos da cultivar Cobrançosa. . Escala de BBCH (adaptada de Sanz-Cortés <i>et al.</i> , 2002).....	36
<b>Quadro 3</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o efeito de cada modalidade em cada data de colheita para a cultivar Arbequina. ( $\alpha= 0,05$ ) (*a sombreado salientam-se os p-value inferiores ao nível de significância). ....	50
<b>Quadro 4</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o tipo de órgão analisado nas diferentes datas de colheita, para ambas a cultivar Arbequina. ( $\alpha= 0,05$ ) (*a sombreado salientam-se os p-value inferiores ao nível de significância). ....	52
<b>Quadro 5</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o efeito de cada modalidade em cada data de colheita para a cultivar Cobrançosa. ( $\alpha= 0,05$ ) (*a sombreado salientam-se os p-value inferiores ao nível de significância). ....	55
<b>Quadro 6</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o tipo de órgão analisado nas diferentes datas de colheita, para a cultivar Cobrançosa. ( $\alpha= 0,05$ ) (*a sombreado salientam-se os p-value superiores ao nível de significância). ....	56
<b>Quadro 7</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre modalidades ao longo das datas de medição, para a cultivar Arbequina ( $\alpha= 0,05$ ). ....	59
<b>Quadro 8</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre as datas de medição para as três modalidades estudadas, para a cultivar Arbequina ( $\alpha= 0,05$ ). (*a sombreado salientam-se os p-value inferiores ao nível de significância). ....	59
<b>Quadro 9</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre modalidades ao longo das datas de medição, para a cultivar Cobrançosa ( $\alpha= 0,05$ ). (*a sombreado salientam-se os p-value inferiores ao nível de significância). ....	60
<b>Quadro 10</b> - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre as datas de medição para as três modalidades estudadas, para a cultivar Cobrançosa ( $\alpha= 0,05$ ). (*a sombreado salientam-se os p-value inferiores ao nível de significância). ....	61

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - Representação da produção de azeite na Bacia do Mediterrâneo (adaptado de FAO, 2013).....	2
<b>Figura 2</b> - Evolução da produção e consumo mundial (1000 t) (Jorge, 2012). ....	3
<b>Figura 3 e 4</b> – Produção, consumo e exportação de azeitona em Portugal para a produção de azeite no período 1990-2012 (1000 t) e para a azeitona de mesa, respetivamente (adaptado de International Olive Council, 2012) .....	4
<b>Figura 5</b> - Fruto, endocarpo e folhas da cv. Arbequina (Adaptado de Olive oil flavors, 2015). .....	8
<b>Figura 6</b> - Folhas, fruto e endocarpo da cv. Cobrançosa (adaptado de Cordeiro <i>et al.</i> , 2010)9	
<b>Figura 7</b> - Frutificação da oliveira sobre ramos de dois anos. Em preto, ramos de um ano; em branco, ramos de dois anos; riscado, ramo de três anos. (Figura de A. Vernet, s.d em Pansiot & Rebour, 1970) .....	10
<b>Figura 8</b> - Curva de crescimento sigmoidal representativa do crescimento da azeitona e das células do mesocarpo indicando várias fases distintas do desenvolvimento (adaptado de Lavee, 1996). ....	13
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática da absorção e assimilação do azoto nas raízes (b) e folhas (a). ( $\text{NO}_3^-$ : nitrato; $\text{NO}_2^-$ : nitrito; $\text{NH}_4^+$ : amónio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN:nitrato redutase; RNi: nitrito redutase; GS:glutamina sintase (adaptado de Imsande & Touraine, 1994) .....	19
<b>Figura 10</b> - Modelo de controlo da taxa de absorção de azoto durante o rápido crescimento vegetativo (a) e durante a fase reprodutiva (b). (Adaptado de Imsande & Touraine, 1994) .....	20
<b>Figura 11</b> - Efeito da aplicação do creme de algas na atividade da enzima nitrato redutase. Os valores apresentados são expresso em $\mu\text{mol}$ de nitritos/ g de peso fresco (Goëmar - Laboratoire de la mer). ....	27
<b>Figura 12</b> - Medida da atividade da clorofila total (em mg/g de peso fresco) (Goëmar - Laboratoire de la mer). ....	28
<b>Figura 13</b> - Ação do creme de algas sobre a enzima fosfatase (Goëmar - Laboratoire de la mer).....	28
<b>Figura 14</b> - Ilustração do equipamento SPAD - 502. 1- Botão ligar/ desligar; 2- Cabeça de medição; 3 - Linha de alinhamento central; 4 - Indicador de máxima profundidade; 5 - Painel LCD; 6- Botão de cálculo da média; 7- Botão de eliminação de dados; 8 - Botão que permite visualizar a última leitura; 9 – Botão de eliminação da última leitura; 10 –	



Bateria; 11- Acessório para facilitar a portabilidade; 12 – Janela de leitura; 13 – Local para colocar o dedo indicador (adaptado de Spectrum Technologies, Inc., 2009) .....	31
<b>Figura 15</b> - Iluminação e medição através do SPAD – 502 (adaptado de Spectrum Technologies, Inc., 2009) .....	32
<b>Figura 16</b> - Classificação climática de Köppen-Geiger (adaptado de IPMA, 2015) .....	33
<b>Figura 17</b> – Esquema representativo do local de ensaio na Quinta Vale de Lobos.....	34
<b>Figura 18, 19 e 20</b> - Amostras em folhas de papel de alumínio mantidas em gelo durante o transporte. Lavagem de folhas para serem pesadas em fresco. Exemplo de amostragem de pequenos frutos.....	35
<b>Figura 21 e 22</b> - Curva padrão BSA. Exemplo de soluções da cultivar Arbequina com extratos vegetais foliares da modalidade simples, prontas para serem lidas no espectrofotómetro. ....	39
<b>Figura 23 e 24</b> - Curva padrão da NR. Exemplo de uma solução da cultivar Cobrançosa com extratos vegetais dos órgãos reprodutores da modalidade simples, prontas para serem lidas no espectrofotómetro. ....	40
<b>Figura 25 e 26</b> - Curva padrão da GS. Exemplo de uma solução da cultivar Cobrançosa com extratos vegetais dos órgãos reprodutores da modalidade testemunha, prontas para serem lidas no espectrofotómetro. ....	41
<b>Figura 27</b> - Gráfico das temperaturas média, máxima e mínima mensais registadas no período de outubro de 2012 a setembro de 2013.....	43
<b>Figura 28</b> - Gráfico das temperaturas máxima, média e mínima diárias registadas ao longo do período de colheita de amostras de material vegetal para o ensaio. ....	44
<b>Figura 29</b> - Gráfico da precipitação total mensal no período de outubro de 2012 a setembro de 2013.....	44
<b>Figura 30</b> - Gráfico da precipitação total diária registada ao longo do período de colheita de amostras de material vegetal para o ensaio. ....	45
<b>Figura 31</b> - Gráfico da radiação média registada ao longo do período de colheita de amostras de material vegetal para o ensaio.....	45
<b>Figura 32</b> - Atividade média da enzima NR ( $\mu\text{mol}$ de nitrito por mg de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Arbequina nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas é o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose	

dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante. ....47

**Figura 33** - Atividade média da enzima GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por mg de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Arbequina nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas é o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante. ....49

**Figura 34** - Atividade média da enzima NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por mg de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas é o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante. ....53

**Figura 35** - Atividade média da enzima GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por mg de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas corresponde ao erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante. ....54

**Figura 36** - Medições do teor de clorofila através do SPAD na cultivar Arbequina. O comprimento das linhas corresponde ao erro padrão ( $n=30$ ). Legenda: Testemunha – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante. ....58

**Figura 37** - Medições do teor de clorofila através do SPAD na cultivar Cobrançosa. O comprimento das linhas corresponde ao erro padrão (n= 30). Legenda: Testemunha – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante. ....60

## **Lista de Abreviaturas**

ANOVA - Análise de Variância

BBCH Biologische Bundesanstalt (Federal Biological Research Centre), Bundessortenamt (Federal Plant Variety Office) and chemical industry

cv. - Cultivar

MO - Matéria orgânica

Mo - Molibdénio

GS - Glutamina Sintetase

N - Azoto

NR - Nitrato redutase

NiR - Nitrito redutase

SPAD - *Soil Plant Analysis Development*

Rpm - Rotações por minuto

## 1. Introdução

A olivicultura é uma das atividades agrícolas que em Portugal apresenta uma grande importância socioeconómica. Nas últimas décadas a paisagem olivícola tem sofrido alterações significativas: o aumento da densidade de plantação, a difusão da rega, da fertilização e do controlo fitossanitário, com ganhos significativos de produtividade, bem como plantação de vastas áreas de olival em solos com maior aptidão agrícola, anteriormente ocupados por outras culturas, nomeadamente cereais, têm procurado responder ao aumento da procura motivado pelo crescente consumo de azeite. Na atualidade, o azeite é um produto muito apreciado e ocupa um lugar privilegiado entre os óleos comestíveis dado o seu valor biológico e nutritivo, bem como o aroma e sabor, características que definem a sua qualidade.

Como qualquer outra cultura, a oliveira necessita de uma nutrição equilibrada, sendo particularmente sensível à falta de azoto, potássio e boro. Este trabalho irá debruçar-se sobre a fertilização, principalmente a fertilização azotada que é de extrema importância para a oliveira, uma vez que impulsiona o crescimento vegetativo influenciando o rendimento e a longevidade da árvore. O objetivo deste trabalho passa por analisar a influência da aplicação foliar do bioestimulante da Selectis, o Goëmar Olivos, um bioestimulante produzido à base de um extrato de algas, no metabolismo do azoto mediante a avaliação das atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase analisadas nas folhas e nos órgãos reprodutores e a avaliação do teor de clorofila nas folhas (indiretamente relacionado com o teor de azoto nos tecidos). O produto utilizado impulsiona uma melhor absorção de nutrientes por via radicular e estimula a migração dos mesmos para os locais de crescimento, além de favorecer o processo de floração e vingamento, de forma a aumentar o rendimento na cultura. O presente trabalho surge, a par de diferentes ensaios que têm vindo a estudar o efeito da aplicação deste bioestimulante em cultivares de oliveira, e visa testar a influência da aplicação deste produto sob duas formas (duas aplicações de 2,5 l/ha cada, uma no fim do repouso, outra na plena floração, uma única aplicação de 5l/ha à plena floração) nas cultivares Arbequina e Cobrançosa do olival da Quinta Vale de Lobos, em Santarém, que se destina unicamente à produção de azeitona para a extração de azeite.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Produção e importância económica da cultura da oliveira

#### 2.1.1. Produção mundial e importância económica

A oliveira é uma cultura que se adapta a regiões climáticas Mediterrânicas, estando a sua produção concentrada a nível mundial entre os paralelos 30° e 45° dos hemisférios norte e sul, devido a fatores edafo-climáticos (Barranco *et al.*, 1999).

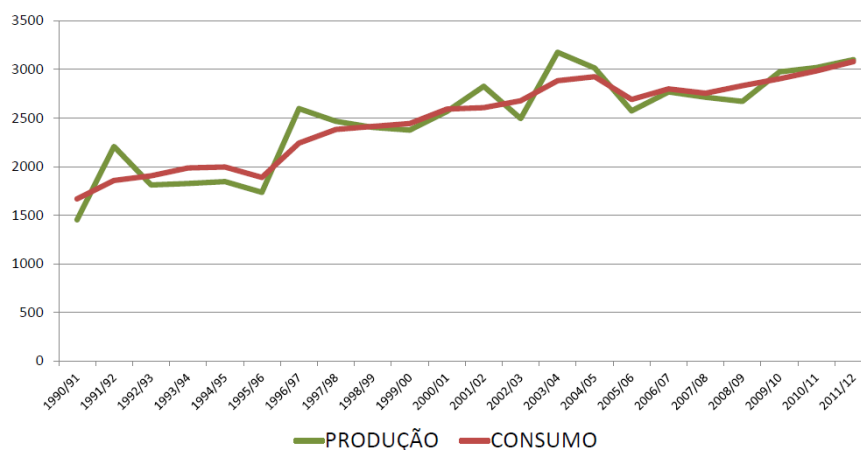
Atualmente, e relativamente à campanha 2012/13, a produção de azeite a nível mundial (2 903 676 t) está concentrada na Europa, detendo 69,03 % da produção total, seguida de Ásia (16,4%), África (13,03%), América (1,3%) e Oceânia (0,23%). A maioria da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica (figura 1), sendo os maiores produtores a Espanha (992 000 t), Itália (570 000 t), Grécia (351 800 t), Turquia (206 300 t) e Síria (200 000 t) (FAO, 2013). Relativamente à União Europeia, Espanha é o maior produtor, representando cerca de um terço da produção mundial, seguida de Itália, Grécia, Portugal e França (Jorge, 2012).



**Figura 1** - Representação da produção de azeite na Bacia do Mediterrâneo (adaptado de FAO, 2013)

A nível mundial tanto a produção de azeite como o seu consumo duplicou nos últimos 20 anos (figura 2), sendo o principal consumidor a União Europeia, seguida dos Estados Unidos que nos últimos 15 anos duplicou o consumo. Os maiores exportadores são, naturalmente, os maiores produtores, destacando a União Europeia e a Tunísia que exportam

as suas produções para países como os Estados Unidos, Brasil, Austrália, Canadá e Japão (Jorge, 2012).



**Figura 2** - Evolução da produção e consumo mundial (1000 t) (Jorge, 2012).

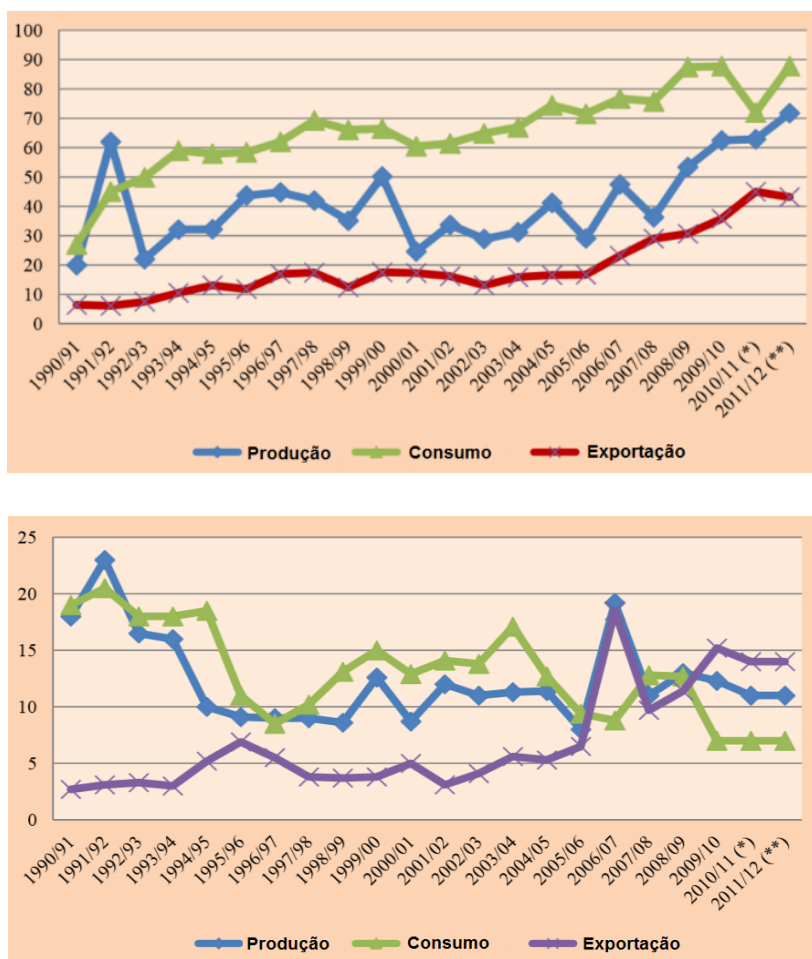
A taxa de crescimento que o olival mundial está a registar deve-se principalmente à modernização dos olivais tradicionais. De acordo com estudos realizados por organizações internacionais, verificou-se um aumento do potencial produtivo com a introdução de novas técnicas agrícolas, a intensificação dos olivais, o investimento em técnicas de regadio, introdução de novas cultivares e a implementação de planos de desenvolvimento para revitalizar olivais antigos (International Olive Council, 2008). Aliada a esta evolução enfatiza-se o reconhecimento e aumento do consumo de azeite devido ao efeito de difusão dos resultados da investigação científica sobre os benefícios do azeite para a saúde, bem como as sucessivas campanhas promocionais levadas a cabo, quer pela União Europeia, quer pelo *International Olive Council* (Casa do Azeite, 2013).

A área total de olival não é homogênea. As áreas marginais representam mais de 25% da área total, mas apenas contribuem com 10% da produção mundial. Os olivais tradicionais são os mais comuns, representando 50% da área total de safra e são responsáveis por 40% da produção mundial. Os olivais mais modernos, cultivados ao longo de linhas inovadoras e adaptados a novas técnicas de cultivo (compassos mais racionais, rega, manejo do solo, automatização da colheita, etc...) ocupam 25% da área de cultivo mas são responsáveis por cerca de 50% da produção mundial de azeite (International Olive Council, 2008).

### 2.1.2. Produção em Portugal e importância económica

Portugal possui uma vocação dominante para a produção de azeitona, nomeadamente para a produção de azeite de qualidade devido às condições edafo-climáticas adaptadas à cultura e à presença de uma diversidade de variedades que potenciam a composição do azeite (MADRP, 2007).

Nos últimos vinte anos a produção de azeitona para a obtenção de azeite tem vindo a aumentar sobretudo à custa dos grandes investimentos em olival regado na região do Alentejo e à aquisição de conhecimento técnico da produção em sebe. Outros fatores que acompanham o aumento da produção, impulsionados pelo aumento da procura, são a melhoria da qualidade, o aumento da exportação e do consumo global (figura 3) (Jorge, 2012). No que respeita à produção de azeitona de mesa, esta reflete mais oscilações, verificando-se uma queda na década de noventa que gerou uma produção precedente estável na ordem das 12 000 t (figura 4).



**Figura 3 e 4** – Produção, consumo e exportação de azeitona em Portugal para a produção de azeite no período 1990-2012 (1000 t) e para a azeitona de mesa, respetivamente (adaptado de International Olive Council, 2012)



Segundo o Instituto Nacional de Estatística, em 2012, a área destinada à cultura do olival foi de 347 292 ha dos quais 97% se destinaram à produção de azeite e os restantes 3% à produção de azeitona de mesa. A região do Alentejo é a principal região produtora, seguida das zonas de Trás-os-Montes e Beira Interior. Enquanto o olival para azeite se localiza no Alentejo, no que se refere ao olival para azeitona de mesa a principal região produtora é Trás-os-Montes.

Portugal é, tradicionalmente, um país com vocação exportadora de azeite. Entre os mercados de destino das exportações nacionais, destaca-se o mercado brasileiro que absorve cerca de 49% do total das exportações nacionais de azeite, fazendo com que este produto seja igualmente o produto português mais exportado para aquele país (Jorge, 2012).

## **2.2. Características botânicas da oliveira**

A oliveira pertence à família *Oleaceae* que contém 20 a 29 géneros de acordo com o sistema de classificação Flahault (1986) e Morettini (1972), respetivamente. Destes, os que têm maior importância económica e hortícola são *Fraxinus*, *Jasmin*, *Ligustrum*, *Olea*, *Phyllyrea* e *Syringa*. O género *Olea* contém várias espécies e subespécies que são maioritariamente árvores ou arbustos. A única espécie com fruto comestível é a *Olea europeae* L. à qual pertence a oliveira cultivada (Lavee, 1996).

A oliveira doméstica é geneticamente de tamanho médio atingindo 4 a 8 metros de altura, dependendo da variedade e possui naturalmente uma copa redonda (Barranco *et al.*, 1999). Destaca-se das restantes árvores de fruto pela sua longevidade, existindo exemplares com várias centenas de anos (Loussert & Brousse, 1980).

É uma espécie originária de clima seco subtropical, adaptando-se bem a condições ambientais extremas, como seca e temperatura elevada, sendo também resistente a baixas temperaturas. É uma árvore de alternância sob todas as condições de crescimento, necessitando de intervenções ao longo do ciclo biológico para minimizar ou prevenir. Este fator de alternância está associado com o crescimento anual e com fatores metabólicos endógenos. Tanto o vigor como o crescimento vegetativo e o tamanho do fruto são dependentes do nível de carga de frutificação, de modo que, em anos de forte produção, o crescimento de novos rebentos é limitado (Lavee, 1996).

## **2.2.1. Estruturas vegetativas**

### **2.2.1.1. Folha**

As folhas da oliveira são persistentes e normalmente sobrevivem dois ou três anos. São simples, de forma lanceolada, com margens lisas e pecíolo curto. O limbo tem entre 3 e 9 cm de comprimento e 1-1,8 cm de largura (Barranco *et al.*, 1999). A forma, tamanho e características da folha podem diferir significativamente de uma cultivar para outra, embora as principais características sejam semelhantes na maioria das variedades. A página superior é verde escura e brilhante devido à presença de uma cutícula de cera, segregada pelas células epidérmicas, que a cobre. Abaixo da epiderme superior, há 2-3 camadas de células que contêm um grande número de cloroplastos de elevado teor em clorofila. E ainda, abaixo destes, existe uma rede de pequenas nervuras e escleróides que proporciona à folha a sua forma rígida. A página inferior contém os estomas e um número elevado de escamas sobrepostas, que em conjunto, funcionam como um dos mecanismos da oliveira para ultrapassar condições de extrema secura, evitando perdas de água por transpiração. A cor da página inferior é prateada devido à presença das escamas (Lavee, 1996).

### **2.2.1.2. Raiz**

A morfologia do sistema radicular da oliveira depende da sua origem e das condições do solo. Quando a árvore resulta de uma semente possui um sistema radicular dominado por uma raiz principal. Ao ser transplantada, a raiz principal atrofia, desenvolvendo-se um sistema radicular fasciculado com raízes mais superficiais. Quando a árvore se propaga por estaca possui um sistema radicular com raízes adventícias que se comportam como múltiplas raízes principais, que após transplantadas, desenvolvem igualmente um sistema radicular fasciculado. Relativamente às condições do solo, o desenvolvimento da raiz em profundidade é naturalmente maior em solos arenosos e soltos face a solos argilosos e mais compactos. A pluviometria também tem influência, pois quando é baixa, as raízes atingem maiores profundidades em busca da humidade em camadas mais profundas, e quando elevada, verifica-se o oposto (Guerrero, 1997).

A absorção de água e nutrientes ocorre nas zonas mais jovens das raízes, sendo estas, mais suscetíveis a infeções por fungos e nemátodos. Apresentam uma coloração branca que ao amadurecerem, tornam-se acastanhadas devido à suberização que ocorre nos tecidos primários e secundários (Barranco *et al.*, 1999).

Lateralmente, as raízes da oliveira podem atingir extensões consideráveis, chegando a entrelaçarem-se com as raízes de oliveiras mais próximas (Guerrero, 1997).

## **2.2.2. Estruturas reprodutivas**

### **2.2.2.1. Inflorescência e flor**

As inflorescências desenvolvem-se nas axilas foliares dos nós do crescimento vegetativo do ano anterior à floração (Barranco *et al.*, 1999). Segundo Loussert *et al.*, (1980) são constituídas por cachos flexíveis, com um número variável de flores que pode variar entre 10 e 40.

Nas inflorescências podem observar-se flores de dois tipos: perfeitas e estaminadas. As primeiras são hermafroditas ou bissexuais, compostas por dois estames e pistilo bem desenvolvido. As estaminadas, masculinas ou imperfeitas têm o ovário ausente e como tal não conseguem originar um fruto. A proporção de flores estaminadas como o número de flores por inflorescência oscila com a cultivar e o ano (Barranco *et al.*, 1999).

As flores são constituídas por quatro sépalas, quatro pétalas, dois estames e dois carpelos. O cálice é gamossépalo e a corola é gamopétala. Os estames estão inseridos na corola. Os carpelos estão soldados a um ovário bilocular e o estilete é, geralmente, curto e bífido (García, 2005).

### **2.2.2.2. Fruto**

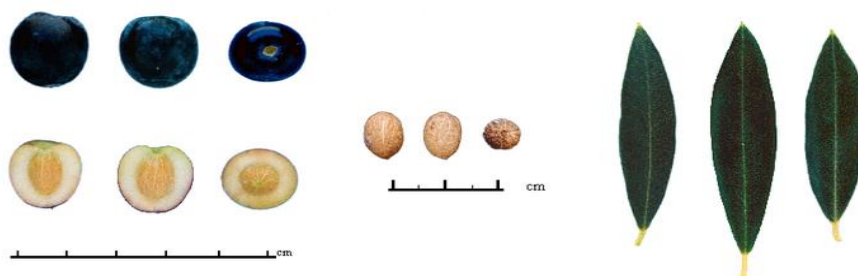
O fruto é uma drupa (azeitona) composto por três tecidos principais: endocarpo (caroço), mesocarpo (polpa) e exocarpo (pele exterior), que em conjunto caracterizam o pericarpo (Barranco *et al.*, 1999). O exocarpo está muito unido ao mesocarpo e durante a maturação passa de verde suave a violeta e posteriormente a tons negros. A forma do fruto varia de elipsoidal a oval e o seu tamanho também difere segundo a cultivar (Loussert & Brousse, 1980). Ao realizar-se a fecundação pode observar-se o pequeno fruto formado. Muitos destes frutos sofrem uma queda fisiológica no mês de junho, podendo afetar 50% dos frutos recém-formados. Nos finais de julho-agosto, coincidindo com o endurecimento do caroço pode-se observar uma segunda queda, por motivos fisiológicos ou por ataques de parasitas, tais como a traça-da-oliveira. O amadurecimento do fruto começa, normalmente, no outono, dependendo da região. (García, 2005).

## **2.2.3. Cultivares em Estudo**

### **2.2.3.1. ‘Arbequina’**

O seu nome provém da localidade de Arbeca em Lérida, local onde se iniciou o seu cultivo. É uma cultivar que se adapta a terrenos pobres e é resistente ao frio. Possui uma copa

relativamente pequena, o que permite maiores densidades de plantação face a cultivares mais vigorosas. É considerada autocompatível com boa capacidade de enraizamento. Apresenta suscetibilidade ao olho de pavão (*Cycloconium oleaginum*), mosca da azeitona (*Dacus oleae*) e cochonilha negra (*Saissetia olea*) e também à clorose férrica em terrenos alcalinos. As folhas são pequenas e de forma elíptico-lanceoladas. Os frutos apresentam uma cor negra na fase de maturação, tamanho reduzido e oval com baixa relação polpa/caroço (figura 5). O endocarpo é oval e simétrico, apresentando uma superfície rugosa (Marti & Aroca, 1993). É uma variedade muito apreciada pela sua precocidade, elevada produtividade, bom rendimento de gordura e pela excelente qualidade do seu azeite, embora este apresente baixa estabilidade (Barranco *et al.*, 1999).



**Figura 5** - Fruto, endocarpo e folhas da cv. Arbequina (Adaptado de Olive oil flavors, 2015).

#### **2.2.3.2. ‘Cobrançosa’**

Cultivar de origem transmontana, bastante regular e produtiva, com vocação para a produção de azeite, estando disseminada por todo o país. É tolerante ao frio e a solos calcários e alcalinos, embora suscetível à seca e à extrema salinidade. Possui uma capacidade de propagação por estaca herbácea mediana. Pode apresentar mediana incidência de mosca da azeitona, olho de pavão, tuberculose e reduzida incidência de gafa. A árvore é de porte médio e com boas produções. As folhas são compridas e estreitas de forma elíptico-lanceolada. Os frutos são de tamanho médio, forma elipsoidal e apresentam cor negra à maturação (figura 6). A polpa tem uma textura consistente pelo que os frutos para além de se destinarem à produção de azeite podem ser utilizados para conserva em fresco. Têm baixa resistência ao desprendimento, mas queda reduzida, pelo que é apropriado à

colheita por vibração. O rendimento em azeite é mediano com mediana riqueza em ácido linoleico (Leitão, 1986).

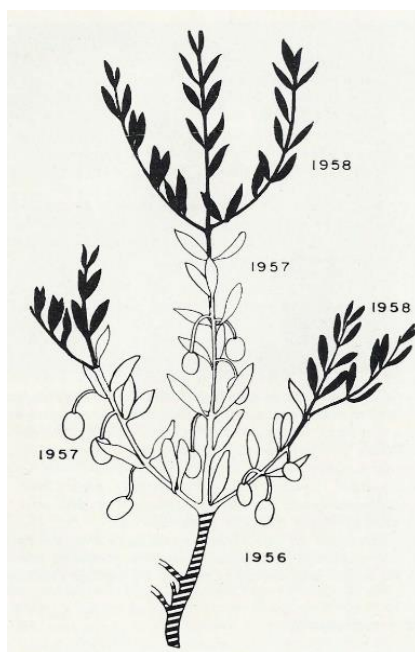


**Figura 6** - Folhas, fruto e endocarpo da cv. Cobrançosa (adaptado de Cordeiro *et al.*, 2010)

#### **2.2.4. Ciclo biológico**

O ciclo vegetativo da oliveira está inteiramente relacionado com o clima que caracteriza a sua área de cultivo, o clima mediterrâneo. Apresenta essencialmente duas estações, um Inverno fresco e húmido e um Verão quente e seco (Loussert & Brousse, 1980).

Na oliveira tanto o crescimento vegetativo como o desenvolvimento reprodutivo são fenómenos cíclicos. No entanto, apesar de ambos se repetirem anualmente, o desenvolvimento reprodutivo requer uma duração de dois anos, devido à frutificação só se completar no segundo ano, sobre ramos do ano anterior, como demonstra a figura 7. Assim no primeiro ano, o desenvolvimento reprodutivo manifesta-se pela formação dos gomos e a sua indução floral e no segundo ano verifica-se o desenvolvimento das inflorescências, a floração, o crescimento e o desenvolvimento dos frutos vingados, culminando o ciclo bianual com a maturação dos mesmos. Dada a simultaneidade dos processos vegetativos e reprodutivos, estes originam fenómenos de competição por nutrientes e fotoassimilados em diversos órgãos da planta, capazes de explicar as oscilações de produção de ano para ano. Em anos de muita carga, os fotoassimilados são principalmente direcionados para os frutos quando estão em desenvolvimento, o que limita o crescimento de novos lançamentos terminais, limitando o número de nós e de potenciais gomos florais. No ano seguinte, a situação inverte, pois haverá uma menor frutificação, sendo os fotoassimilados tanto direcionados para os frutos como para o crescimento de novos lançamentos (Barranco *et al.*, 1999).



**Figura 7** - Frutificação da oliveira sobre ramos de dois anos. Em preto, ramos de um ano; em branco, ramos de dois anos; riscado, ramo de três anos. (Figura de A. Vernet, s.d em Pansiot & Rebour, 1970)

No hemisfério norte, após o período de repouso vegetativo que se estende de novembro a fevereiro, a oliveira inicia o seu abrolhamento (março-abril) com o aparecimento de novos lançamentos terminais e a eclosão de gomos axilares (García, 2005). São necessárias temperaturas superiores a 12 °C para reinduzir o crescimento na Primavera (Lavee, 1996). Abaixo de 12 °C podem verificar-se danos nas folhas, ramos e tronco (Loussert & Brousse, 1980). Por vezes em situações de Inverno com temperaturas benignas, o repouso vegetativo pode não completar-se o que torna a oliveira mais sensível a eventuais descidas da temperatura em fases mais adiantadas do ciclo (García, 2005). O repouso vegetativo também tem influência em fenómenos como a floração e a frutificação, e segundo Hartmann (1953) citado em García (2005), ambos os fenómenos mantêm uma relação com o número de horas de frio a que a oliveira está sujeita. O número de horas de frio requeridas para uma floração máxima varia de acordo com a variedade (Hartmann & Porlingis, 1957 citado em García, 2005).

A quantidade de gomos que se diferencia num ramo pode variar de 0% a 95% dos gomos da vegetação do ano anterior. O grau de diferenciação dos gomos é controlado por fatores endógenos e exógenos. A interação entre todos os fatores envolvidos conduz ao grau de expressão da diferenciação potencial em cada árvore, numa base individual. Assim, os gomos em desenvolvimento são de natureza indiferente e necessitam de sofrer diferenciação para cada tipo de desenvolvimento posterior, seja ele vegetativo ou floral (Lavee, 1996). A

eclosão de gomos vegetativos é mais tardia face a gomos florais. O fluxo de crescimento vegetativo primaveril é o mais importante do ciclo, tendo uma duração até meados de julho. Pode ocorrer um segundo fluxo de crescimento entre setembro e outubro com a descida da temperatura diária, quando há humidade suficiente no solo ou sob condições de rega. Ou ainda pode existir anos em que o fluxo de crescimento vegetativo é irregular, nomeadamente em anos de pouca produção (Barranco *et al.*, 1999 ; Lavee, 1996)

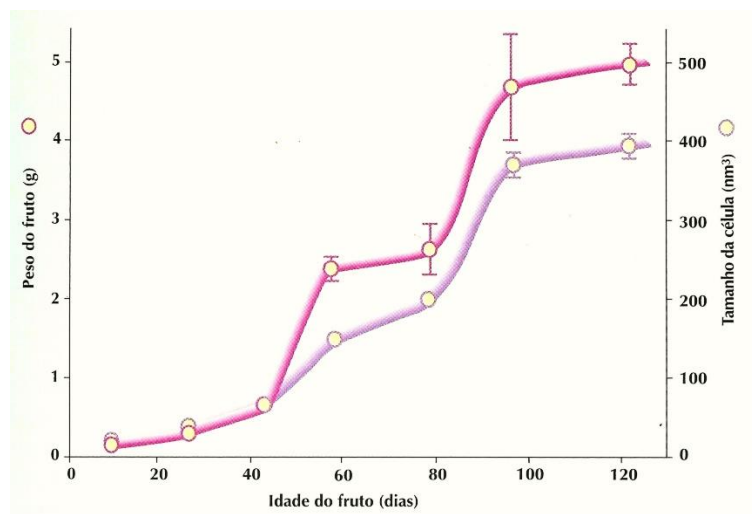
Em fevereiro e março, inicia-se o período de diferenciação floral, começando-se a observar a eclosão dos gomos florais, com o aparecimento e alongamento do eixo da inflorescência acompanhada pela formação dos primórdios das sépalas, pétalas, estames e pistilo. Segundo De Almeida (s.d.) citado em Loussert *et al.* (1980), em Portugal a diferenciação floral não acontece até cerca de noventa dias antes da floração. Terminada a diferenciação floral, as inflorescências continuam o seu crescimento e desenvolvimento, e à medida que as temperaturas vão suavizando, as flores terminam a sua evolução, começando a época de floração (maio-junho) (Loussert & Brousse, 1980). A época de floração depende essencialmente de dois aspetos: período antecedente à floração e o desenvolvimento dos órgãos florais. O principal fator que determina a época de plena floração é a temperatura. Quando esta é elevada nos meses de março e abril antecipa a floração, e quando é mais baixa, verifica-se o contrário. A temperatura também é responsável pela duração do período de floração, sendo este tanto mais longo quanto menores forem as temperaturas. O desenvolvimento dos órgãos florais está intimamente relacionado com a disponibilidade de assimilados presentes na oliveira, pois estes promovem fenómenos de competição entre os vários órgãos da planta, podendo afetar o desenvolvimento das inflorescências e a sua capacidade frutífera. No período de floração realiza-se a polinização com a libertação de grãos de pólen das anteras dos estames mais maduros (Loussert & Brousse, 1980). O pólen da oliveira é facilmente disseminado pelo vento (polinização anemófila) e a sua direção durante a floração tem de ser considerada no desenho do pomar, para determinar o número de árvores polinizadoras necessárias à sua distribuição (Lavee, 1996). A polinização pode ser cruzada, caso o pólen se deposite sobre estigmas de flores de outras variedades, ou autopolinização caso o pólen se deposite em flores da mesma variedade, apesar de este último fenómeno ser considerado raro por alguns autores no caso da oliveira (García, 2005). Assim sendo, a oliveira é considerada uma espécie preferentemente alógama, pois o pólen de outra variedade compatível tem mais êxito na fecundação que o pólen do próprio genótipo (Barranco *et al.*, 1999). Durante esta época são necessárias condições climáticas que permitam uma eficiente polinização. A precipitação durante a floração minimiza a disseminação do pólen. A ocorrência de vento quente e seco durante a época de floração pode reduzir a produção uma vez que seca o estigma, inibe o crescimento do tubo polínico e pode haver uma rejeição do zigoto pelo

ovário. Estes ventos podem ainda causar a morte de ovários já polinizados. Quer climas quentes e secos, quer frios e húmidos, durante a floração podem conduzir a um aumento considerável de frutos partenocárpicos (Lavee, 1996). Estes frutos não fecundados são mais pequenos e mais achatados. Não têm valor comercial e normalmente não permanecem até à colheita (Barranco *et al.*, 1999).

Uma vez realizada a polinização dá-se a fecundação, as pétalas começam a cair e os ovários tornam-se visíveis no seio do cálice. O número de frutos vingados por inflorescência depende da cultivar, das condições climáticas, do número de inflorescências por determinado comprimento de crescimento anual e da uniformidade da floração. Altamura Betti *et al.* (1982) citado em Lavee (1996) afirma que sob condições de desenvolvimento normal, todos os ovários não fertilizados caem, deixando na árvore apenas os fecundados, que eventualmente desenvolverão frutos normais. Porém nalgumas cultivares ou em anos ocasionais poderão desenvolver-se frutos partenocárpicos (Lavee, 1996). A queda de ovários não fertilizados, como a de frutos recém-formados é considerada natural e ocorre normalmente em junho. Deve-se a uma competição pelos assimilados direcionados para o crescimento inicial dos frutinhos, o que traduz numa massiva abscisão (até 50%) tanto de frutos pequenos como de ovários não fertilizados. Uma vez estabelecida a população de frutos após este período, estes continuam o seu crescimento até à maturação podendo eventualmente sofrer quedas devido a causas acidentais ou patológicas (Barranco, 1999; Loussert & Brousse, 1980). Desde a fertilização até à maturação completamente escura, Hartmann *et al.* (1949) consideram cinco estados de desenvolvimento do fruto (figura 8). Primeiramente verifica-se uma rápida divisão celular que envolve principalmente o crescimento do endocarpo e, em menor escala, do mesocarpo e exocarpo. O crescimento atenua-se normalmente no início de Julho com a esclerificação (endurecimento do endocarpo). Daí em diante, o crescimento é mais lento, o embrião e o endocarpo atingem o seu tamanho final, e o endurecimento do endocarpo completa-se. No fim deste período, finais de Julho, dá-se o maior alargamento das células do mesocarpo (polpa) e assim ocorre o crescimento rápido dos frutos. Durante esta última fase iniciam-se processos como a biossíntese e acumulação de azeite (lipogénese). O estado de crescimento rápido dos frutos termina no Outono e inicia-se a mudança de cor. A partir desta fase, o crescimento é substancialmente mais lento e têm lugar vários processos de maturação (Lavee, 1996). Durante este período o fruto adquire todas as suas qualidades dietéticas e organoléticas até à sua colheita. A época de colheita é determinante para a manutenção da qualidade, pois se o fruto permanece demasiado tempo na árvore começa a perder peso e os fenómenos de oxidação começam a alterar a qualidade do azeite (aumenta o grau de acidez). A resistência do pedúnculo à abscisão diminui o que propicia a queda dos frutos ao menor movimento, podendo esta ser mais acentuada devido aos ataques de patógenos como a



mosca da oliveira (Loussert & Brousse, 1980). No Inverno a oliveira entra novamente no estado de repouso vegetativo (García, 2005).



**Figura 8** - Curva de crescimento sigmoidal representativa do crescimento da azeitona e das células do mesocarpo indicando várias fases distintas do desenvolvimento (adaptado de Lavee, 1996).

## 2.2.5. Condições edafo-climáticas

### 2.2.5.1. Temperatura

O cultivo da oliveira está associado ao clima mediterrânico e sendo a oliveira originária deste tipo de clima, adapta-se bem a condições climáticas adversas, como a seca e a temperatura elevada (Lavee, 1996), desde que a alimentação hídrica seja satisfatória. A oliveira necessita em média de 400 horas de frio, com temperaturas médias a rondar os 9°C durante os meses de repouso vegetativo. Durante este período, uma diminuição drástica da temperatura pode causar efeitos adversos. Temperaturas na ordem dos -5°C a -6°C podem ser prejudiciais (Loussert & Brousse, 1980), podendo provocar a queda dos gomos aquando a quebra da dormência (Barranco *et al.*, 1999), agravando-se com descidas repentinas. Contudo se ao longo do período invernal a descida da temperatura ocorrer de uma forma gradual, chegando aos -12°C, os danos tendem a ser menos expressivos (Loussert & Brousse, 1980). O mesmo sucede com temperaturas elevadas (> 30°C) durante o período de repouso vegetativo, podendo alterar a diferenciação morfológica normal dos gomos florais na primavera (Barranco *et al.*, 1999).

A quebra da dormência e início do período vegetativo ocorre quando a temperatura ronda os 10 °C e 12°C, o desenvolvimento das inflorescências ocorre a cerca de 15 °C, a floração, normalmente, tem lugar aos 18°C e durante a fecundação chega aos 21°C ou 22°C. Um desenvolvimento vegetativo ótimo manifesta-se com temperaturas compreendidas entre os 12°C e os 22°C. Acima de 35°C a oliveira regula a sua temperatura mediante o fecho dos estomas, que pode levar a uma paragem no desenvolvimento (Loussert & Brousse, 1980).

#### **2.2.5.2. Necessidades hídricas**

A oliveira, como espécie xerófita, isto é, adaptada a climas secos, pode ser cultivada em regiões cuja precipitação ronda os 200 mm/ano. No entanto, os potenciais de produção só se atingem face a precipitações superiores a 500 mm/ano (Milheiro, 1992, citado em Lopes, 2011). O clima mediterrânico apresenta precipitações anuais irregulares, com maior incidência na estação invernal (novembro a fevereiro), período em que as árvores estão maioritariamente em repouso vegetativo. Durante o verão (junho, julho e agosto), as precipitações são praticamente nulas ou pouco representativas, resultando numa evaporação imediata e num humedecimento da camada superficial do solo (Loussert & Brousse, 1980). Nesta altura, os olivais cobrem uma boa parte das suas necessidades de água à custa das reservas hídricas do solo, pelo que é importante armazenar uma maior quantidade de água do terreno, removendo as ervas e reduzindo as perdas por evaporação (Lopez-Villalta, 1996).

A oliveira é uma espécie que se adapta a condições de seca, dispondo de mecanismos que permitem resistir a situações de escassez de água. Possui folhas com poucos estomas, situados na página inferior da folha e protegidos da radiação solar direta, onde se cria um microclima mais húmido que permite a redução da taxa de transpiração. As folhas enrolam-se e os estomas só abrem de manhã durante um curto espaço de tempo. Um extenso sistema radicular permite aproveitar a humidade contida num grande volume de solo. Aumenta a pressão osmótica, o que faz com que a árvore seja capaz de extrair água de solos com baixo conteúdo de humidade. Parte da água que se encontra no fruto é translocada até às folhas, o que pode resultar numa queda prematura dos frutos (Guerrero, 1997). A capacidade de adaptação a condições adversas tem como contrapartida a interrupção no desenvolvimento da oliveira, diminuindo a formação de lançamentos e de gomos, bem como a produção, em caso de *stress* prolongado e em função do estado de reservas em humidade (Lopez-Villalta, 1996).

### 2.2.5.3. Solo

Os olivais ocupam uma vasta diversidade de solos, sendo a sua produtividade fortemente influenciada pelo tipo de solo. As características físicas que afetam o desenvolvimento radicular da oliveira são a textura, a profundidade útil, as condições de arejamento e a erodibilidade. A oliveira prefere solos soltos de texturas moderadamente finas, que normalmente, proporcionam um arejamento adequado ao crescimento radicular, são suficientemente permeáveis e possuem uma boa capacidade de retenção de água, indispensável à sobrevivência de olivais de sequeiro. No que respeita a profundidade, as raízes estendem-se até à profundidade onde se encontra a camada rochosa ou até à camada limitativa do movimento de água, arejamento e desenvolvimento radicular. Por norma, o sistema radicular da oliveira é moderadamente superficial, atingindo em média 1,20 metros. As raízes da oliveira são muito sensíveis ao encharcamento, especialmente no período de crescimento ativo, quando submetidas durante um longo período de tempo. Aliada à topografia do terreno, que pode contribuir para o encharcamento, a estratificação do terreno manifesta alguma relevância tanto pela cimentação de novos horizontes como pela existência de camadas argilosas intercaladas no perfil de solo, que estagnam o movimento da água contribuindo para o encharcamento. Relativamente à erodibilidade dos solos, esta representa um problema grave, principalmente em olivais plantados em zonas montanhosas com grandes declives. Quando a erosão é severa, pode deixar raízes a descoberto, causar dissecação de algumas partes do terreno e provocar danos no solo que dificultam as práticas de cultivo. A erosão hídrica é considerada relevante pois resulta na perda do material mais fértil do solo (Barranco *et al.*, 1999).

As características químicas do solo mais relevantes para um olival são o pH e a salinidade. A oliveira desenvolve-se bem em solos moderadamente ácidos ou alcalinos (pH entre 5,5 e 8,5). Quando plantadas em solos mais ácidos podem verificar-se problemas de toxicidade em alumínio e magnésio e quando cultivadas em solos mais alcalinos (solos sódicos) a sua fraca estrutura impede a penetração de água e dificulta a drenagem (Barranco *et al.*, 1999). Relativamente aos níveis de salinidade limite, estes variam de acordo com as variedades, no entanto, assumem-se valores na ordem dos 4 dS.m<sup>-1</sup> chegando mesmo aos 6 dS.m<sup>-1</sup>, em cultivares bem adaptadas (Lavee, 1996). É sensível a situações de carência do elemento Boro (B), contudo, perante o excesso do mesmo é mais tolerante que outras fruteiras (Barranco *et al.*, 1999)

## **2.3. Dinâmica do azoto (N) no sistema solo-planta**

### **2.3.1. Azoto no solo**

O azoto (N) é o nutriente que mais frequentemente limita o crescimento vegetal, sendo a sua aplicação ao solo ou por via foliar, a que provoca efeitos mais imediatos no crescimento e na produção das culturas (Marcelo, 2001; Varennes, 2003). Mais de 95% do azoto encontra-se nos solos em formas orgânicas, sendo a forma aminada (amino-N), presente nos aminoácidos, péptidos e açúcares aaminados, a fonte mais importante para a mineralização do N (Neto, 2007; Varennes, 2003). No entanto, grandes quantidades de N estão incorporadas em substâncias húmicas, estando protegidas do ataque microbiano. Consequentemente, apenas 1 a 3% desse azoto é mineralizado em cada ano, sendo convertido por mineralização a formas de N inorgânico ( $\text{NH}_4^+$ ) por organismos decompositores (bactérias, actinomicetas e fungos). O ião amónio, resultante da mineralização da matéria orgânica do solo, é utilizado por bactérias autotróficas ou heterotróficas (em menor quantidade) que o vão oxidar a ião nitrato, processo designado por nitrificação. Desta forma, o N mineral nas formas de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  encontra-se disponível para as plantas (Simek & Cooper, 2001; Varennes, 2003).

O N inorgânico existente no solo, além de derivar, fundamentalmente, da matéria orgânica (MO) do solo, provém do N atmosférico ( $\text{N}_2$ ), do N dissolvido na água da chuva ou dos fertilizantes minerais azotados. Em solos aráveis, e em condições favoráveis à nitrificação (disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  e de oxigénio), o  $\text{NO}_3^-$  está geralmente presente em maior quantidade do que o  $\text{NH}_4^+$ , enquanto nalgumas pradarias e florestas de coníferas, o N amoniacal predomina dadas as baixas temperaturas, o elevado teor de MO no solo, um menor pH e menor arejamento (Martins-Loução e Cruz, 1999 citado em Neto, 2007).

O azoto no solo sofre várias transformações bióticas e abióticas que resultam numa circulação do azoto no ecossistema, contribuindo para o seu ciclo global (Simek & Cooper, 2001). O ião nitrato representa normalmente a principal forma de azoto mineral na solução do solo sendo bastante móvel, por não ser facilmente adsorvido na matriz do solo, aproximando-se das raízes sobretudo por fluxo de massa. O azoto nítrico é a forma azotada adsorvida em maior quantidade pela maior parte das plantas. O  $\text{NO}_3^-$  é perdido do sistema solo-planta por lixiviação e desnitrificação<sup>1</sup>, sendo que para além do impacto económico, ambos os processos conduzem a impactos ambientais negativos. A lixiviação interfere na qualidade das águas

enquanto a desnitrificação<sup>1</sup> contribui para o aquecimento global e a destruição da camada de ozono. O ião amónio, além de ser absorvido pelas plantas, é preferido pelos microrganismos face ao ião nitrato. Quando hidratado, é facilmente adsorvido no complexo de troca catiónica, mantendo-se disponível para as plantas por ser facilmente permutado com outros iões, ficando em simultâneo, parcialmente protegido das perdas por lixiviação (Varennnes, 2003).

### **2.3.2. Absorção e circulação do N na planta**

O azoto é maioritariamente absorvido pelas raízes das plantas, embora possa também entrar pela parte aérea, através dos estomas e microporos das folhas. Os nutrientes na forma gasosa, principalmente amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) e dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ), penetram nos estomas e são rapidamente metabolizados nas células vizinhas (Varennnes, 2003). As plantas podem absorver formas orgânicas de N do solo de baixa massa molecular, como os aminoácidos, amidas, ureia, embora estes compostos azotados não constituam a maior fonte de N para a sua nutrição. No entanto, em plantas que habitam em ecossistemas limitados pelo N em solos inférteis, muito ácidos e climas frios, a forma orgânica de N é a fonte mais utilizada (Raven *et al.*, 1999 citado em Neto, 2007). As formas inorgânicas de N ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) são preferencialmente absorvidas pelas plantas, em quantidades e proporções que dependem, entre outros fatores, da espécie, idade e disponibilidade de carboidratos na planta (Mengel & Kirby, 2001).

O ião amónio, quando absorvido pelas raízes tem de ser incorporado em compostos orgânicos nesse local, dada a toxicidade do amoníaco para as células e o seu efeito acidificante na rizosfera. O ião nitrato é inócuo e pode ser translocado no xilema para a parte aérea podendo ser acumulado nos vacúolos, quer da raiz quer da parte aérea (Varennnes, 2003). A assimilação de amónio está associada à diminuição do pH na solução nutritiva do solo enquanto a assimilação de nitrato ao aumento do pH (Mengel & Kirby, 2001). A forma inorgânica preferencialmente absorvida pelas plantas depende das características específicas de cada espécie (Nicodemus *et al.*, 2008). Enquanto o ião amónio é adsorvido e fixado na matriz do solo, o ião nitrato permanece em solução, não sendo adsorvido ou precipitado. Por conseguinte, o ião amónio existe em baixa concentração na solução do solo, aproximando-se das raízes principalmente por difusão, enquanto o ião nitrato movimenta-se sobretudo por

---

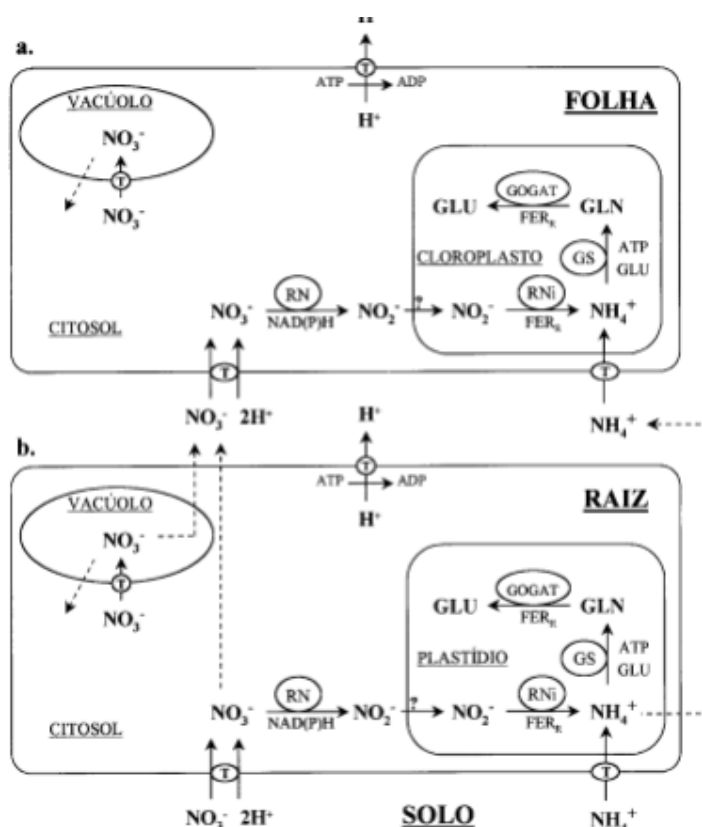
<sup>1</sup> Desnitrificação: Redução do ião nitrato a óxido di-azoto ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e azoto molecular ( $\text{N}_2$ ) realizada por diversos géneros de bactérias anaeróbias. Ou redução do ião nitrito a azoto molecular e óxidos de azoto ( $\text{NO}$  e  $\text{NO}_2$ ) em resultado de reações com compostos orgânicos ou espontaneamente.

fluxo de massa, atingindo as raízes mais rapidamente e em maior quantidade. Em resultado destas diferenças, a maior parte das plantas vai ter à sua disposição o íon nitrato e apenas pequenas quantidades de azoto amoniacal. Contudo, quando ambas as formas estão disponíveis em quantidades semelhantes, as plantas absorvem preferencialmente o íon amónio pois a sua assimilação pelas raízes exige menos energia e poder redutor em relação à assimilação do íon nitrato, visto este, ter de ser primeiro reduzido a amoníaco antes de ser incorporado em moléculas orgânicas (Varennnes, 2003).

A absorção de N é modulada pela presença de transportadores específicos e afinidade destes com os íões nitrato e amónio, quantidade de N presente no solo, atividade das enzimas envolvidas no ciclo, disponibilidade de energia necessária para os processos de absorção e assimilação e do estágio de desenvolvimento da planta. A absorção de azoto ocorre geralmente com o movimento de dois prótons sujeitos a um baixo gradiente eletroquímico, necessitando a reação de ATP de modo a manter o ciclo do  $H^+$  - ATPase que é essencial para manter o gradiente de  $H^+$  através da membrana plasmática (McClure *et al.*, 1990; Meharg & Blatt, 1995; Miller & Smith, 1996 citados em Mengel & Kirby, 2001, citado em Capela, 2013).

A assimilação do íon amónio nas raízes é regulada pelo fluxo de carbono proveniente dos fotoassimilados produzidos na parte aérea que são translocados para a raiz. A produção e translocação de hidratos de carbono depende de vários fatores, como a intensidade luminosa, a temperatura do solo, a disponibilidade de azoto, a proporção lançamentos:raiz e da eficiência das raízes (Martins-Loução e Cruz, 1999; Eissenstant *et al.*, 2001 citado em Neto, 2007). A rápida assimilação do íon amónio em aminoácidos e proteínas suprime as necessidades de energia da reação na forma de ATP e NADPH (Mengel & Kirby, 2001).

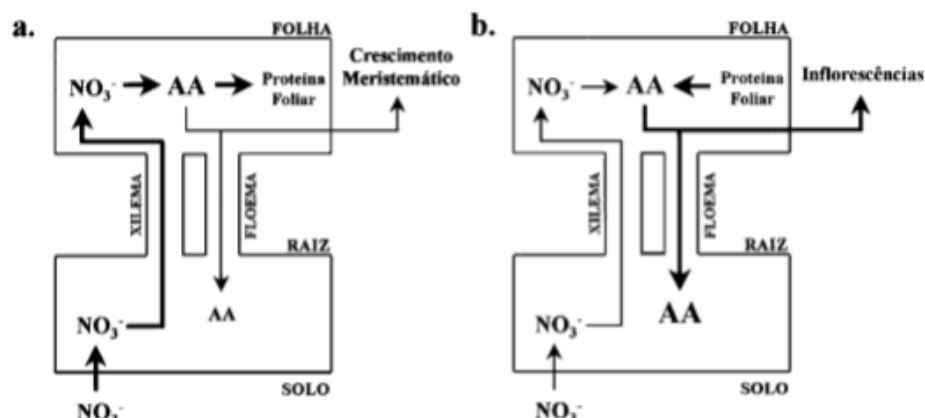
O íon nitrato é absorvido por transporte ativo, sendo reduzido a nitrito ( $NO_2^-$ ) pela enzima nitrato redutase (NR) no citosol, e posteriormente convertido em íon amónio no plastídio pela enzima nitrito redutase (NRi). O íon amónio é incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos (figura 9) (Crawford, 1995 citado em Bredemeier & Mundstock, 2000). O íon nitrato pode ainda ser armazenado nos vacúolos das células da raiz, ser assimilado em aminoácidos constituindo reservas na raiz, ser translocado via xilema até às folhas onde é reduzido ou também armazenado como reservas (Nicodemus *et al.*, 2008).



**Figura 9** - Representação esquemática da absorção e assimilação do azoto nas raízes (b) e folhas (a). ( $\text{NO}_3^-$ : nitrato;  $\text{NO}_2^-$ : nitrito;  $\text{NH}_4^+$ : amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN:nitrato redutase; RNi: nitrito redutase; GS:glutamina sintase (adaptado de Imsande & Touraine, 1994)

Investigações realizadas por Lee e Rudge (1986) e Cooper e Clarkson (1989) sugerem que os metabolitos azotados, como os aminoácidos, atuam como sensores de nível de azoto na planta, produzindo sinais que regulam a absorção e assimilação de N na planta (Miller *et al.* 2007). Engels e Marchner (1995) afirmam que no floema o transporte de azoto é maioritariamente feito na forma de aminoácidos, embora estes também circulem no xilema, mas em concentrações mais reduzidas. Apoiando a hipótese anterior, a translocação floémica de aminoácidos, dos lançamentos para a raiz, atua como sinal para o controlo da assimilação de nitrato. Por exemplo, quando se verifica um rápido crescimento vegetativo, as taxas de redução de nitrato e síntese de aminoácidos nas folhas são elevadas, sendo estes direccionados para o desenvolvimento de novos órgãos, síntese de clorofila, rubisco e outras proteínas. Paralelamente, haverá uma diminuição na taxa de translocação de aminoácidos via floémica, diminuindo a disponibilidade de energia nas raízes, o que reduz a taxa de absorção de azoto (figura 10a). Por outro lado, durante a fase reprodutiva, a taxa de redução do nitrato diminui devido à remobilização do N foliar para o desenvolvimento das inflorescências, aumentando a exportação de aminoácidos das folhas para as raízes (figura

10b) (Mengel & Kirby, 2001). O fornecimento de aminoácidos, mais especificamente, da glutamina e de  $\text{NH}_4^+$ , inibe a absorção de  $\text{NO}_3^-$  (Miller *et al.* 2007).



**Figura 10** - Modelo de controlo da taxa de absorção de azoto durante o rápido crescimento vegetativo (a) e durante a fase reprodutiva (b). (Adaptado de Imsande & Touraine, 1994)

Uma diferença relevante na absorção de N nas formas inorgânicas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) reside na sensibilidade destes iões ao pH do meio nutritivo. A taxa de absorção de  $\text{NH}_4^+$  é mais favorável em meios neutros e decresce com a descida do pH. Na taxa de absorção de  $\text{NO}_3^-$  verifica-se o oposto, ou seja, vai aumentando com a diminuição do pH devido à maior disponibilidade de protões que providencia o co-transporte do ião nitrato (Mengel & Kirby, 2001).

Quando ambas as formas inorgânicas de azoto estão disponíveis para as plantas, a absorção de amónio pode influenciar negativamente a absorção de nitrato, causando nesta um decréscimo (Kronzucker *et al.*, s.d citado em Miller *et al.*, 2007). Tal fato deve-se ao menor gasto energético implícito na absorção de  $\text{NH}_4^+$ , que se encontra na forma reduzida pronto para ser assimilado, tal como os aminoácidos. No entanto, em contraste com os aminoácidos, pode haver a necessidade de maiores gastos energéticos quando a concentração do meio nutritivo é elevada e a concentração no interior da planta também é elevada, havendo a necessidade de regular o pH celular de forma a evitar toxicidade celular provocada por elevadas quantidades de  $\text{NH}_4^+$  (Raven e Smith, 1976; Britto *et al.*, 2001 citado em Miller *et al.*, 2007). A absorção do ião nitrato implica maior gasto de energia para a planta, que varia consoante o local onde ocorre a redução, raízes ou parte aérea. Quando o ião nitrato é reduzido nas raízes pode haver um aumento da respiração, incrementando o gasto energético mas quando a reação ocorre nas folhas a fonte de energia e o poder redutor (ATP e NAD(P)H) advêm da fotossíntese, diminuindo o dispêndio energético (Zogg *et al.* e Schrader, 1984 citado em Nicodemus *et al.*, 2008). Se a intensidade luminosa for alta, a redução do ião nitrato ao nível das folhas não tem praticamente custos para a planta, sendo realizada durante o dia



quando se dá a fotossíntese. Se a intensidade luminosa for baixa poderá haver competição entre a redução do íon nitrato e a do dióxido de carbono, havendo uma maior absorção e acumulação de  $\text{NO}_3^-$  nos vacúolos (Varennnes, 2003). De um modo geral, a absorção de  $\text{NO}_3^-$  é favorecida pelo maior estado energético das plantas e aumenta durante o período diurno quando há fotossíntese (Lopes, 2011). A absorção de  $\text{NH}_4^+$ , aparentemente, sofre uma menor influência por parte do estado energético das plantas, embora o seu processo de assimilação nas raízes requeira a presença de esqueletos carbonatos e energia (ATP e NA(D)PH) (Mengel & Kirby, 2001).

### **2.3.3. Azoto e a oliveira**

O azoto é o elemento a que a oliveira responde mais rapidamente, acelerando e aumentando geralmente a produção da cultura, sendo um elemento base na fertilização de um olival (Barranco, 1999; López-Villalta, 1996). Promove a atividade vegetativa da oliveira, induzindo maior crescimento dos raminhos, folhas, tronco e raízes, aumenta a quantidade de clorofila e a capacidade de assimilação de outros nutrientes (López-Villalta, 1996; Marcelo, 2001). Tem também uma importância fundamental nos fenómenos de floração e frutificação dado que pode aumentar o número de inflorescências, o vingamento e diminuir o aborto do ovário e a queda dos frutos (Fernandez-Escobar, 2008).

Sendo uma espécie perene, a oliveira possui órgãos de reserva nos quais vai acumulando nutrientes ao longo do ciclo, reutilizando-os em momentos de maiores necessidades nutritivas. Este fato constitui uma grande vantagem relativamente às espécies anuais. Segundo Barranco *et al.* (1999), as folhas constituem um importante local de armazenamento de azoto, tal como as raízes, a casca do tronco e os ramos. Este N armazenado será, posteriormente, mobilizado para órgãos em crescimento, durante a Primavera.

As necessidades da oliveira em azoto apresentam um máximo desde a diferenciação dos gomos, em fevereiro-março, até ao vingamento do fruto, em maio-junho, e um outro no período de endurecimento do caroço, em julho-agosto. A floração e o vingamento exigem maiores quantidades do nutriente, representando cerca de um terço da totalidade, uma vez que em simultâneo desenvolvem-se os novos lançamentos que sustentarão os frutos do ano seguinte (Ferreira *et al.*, 1980; Pansiot e Rebour, 1961 citado em Marcelo, 2001). O teor de azoto nas folhas começa a decrescer com o início da rebentação de novos lançamentos até ao endurecimento do caroço, podendo prolongar-se em situações de ausência de humidade no solo. Posteriormente, verifica-se um aumento no teor foliar de azoto que estabiliza quando começa o repouso invernal. Em anos de elevada produção o teor de azoto nas folhas pode diminuir na época de colheita (Capela, 2013).

A necessidade da oliveira em azoto é mediada pelo tamanho da árvore, nível produtivo, solo, clima, sendo a realização de análises foliares periódicas, uma ferramenta que permite analisar a necessidade de aumentar ou diminuir a dose aplicada (Barranco *et al.*, 1999). O excesso de azoto degrada o ambiente e na oliveira não causa sintomas visíveis, mas afeta negativamente a qualidade das flores, frutos e dos produtos derivados, como o azeite, podendo também reduzir a longevidade dos óvulos (Férrandez-Escobar *et al.*, 2004; Férrandez-Escobar *et al.*, 2006 e Weinbaum *et al.*, 1992 citados em Fernandez-Escobar, 2008). Além disso, torna as árvores mais sensíveis ao frio e mais suscetíveis ao ataque de pragas e doenças (Barranco *et al.*, 1999). A deficiência de N reduz o crescimento dos ramos e provoca o aparecimento de clorose nas folhas. Em relação ao desenvolvimento reprodutivo, baixas concentrações de N provocam o aborto do pistilo, contudo, este fenómeno torna-se marginal quando comparado com as características genéticas das variedades ou com o défice de água durante a diferenciação floral em março (Fernandez-Escobar, 2008).

Sendo o azeite um dos principais derivados da azeitona realça-se a influência da nutrição azotada no resultado do produto final. Segundo Erel *et al.* (2013), a nutrição mineral tem um efeito insignificante na qualidade do azeite. São os fatores genéticos como as variedades utilizadas, o clima, a irrigação, o nível de maturação dos frutos, nível de estragos e o método de extração utilizado, que mais contribuem para as propriedades qualitativas. Considerando um longo período de tempo, elevadas aplicações de N provocam um decréscimo de polifenóis, o que contribui para uma menor estabilidade do produto final. Já Morales-Sillero *et al.* (2007) citado em Erel *et al.* (2013) verificou que o aumento de N, P e K contribuem para a diminuição de polifenóis, estabilidade e acidez no azeite. Recentes estudos elaborados por Tekaya, M. *et al.*, 2013 citados em Erel *et al.*, 2013 também revelaram que a aplicação de azoto via foliar aumenta o nível de fitoesteróis e reduz o conteúdo de polifenóis. Contudo, a influência que a fertilização mineral exerce na qualidade do azeite é limitada e inconsistente, uma vez que as diversas conclusões encontradas nos vários estudos elaborados até hoje possuem várias explicações e divergências entre elas. Tudo dependerá do sistema de cultivo (tradicional ou moderno), tipo de solo, clima, entre outros fatores já mencionados.

#### **2.3.4. Enzimas do metabolismo do azoto estudadas**

##### **2.3.4.1. Nitrato-redutase**

Os conhecimentos atuais do metabolismo vegetal permitem assegurar que o azoto absorvido na forma de nitrato não pode ser utilizado pela planta, ficando retido nos vacúolos das plantas, necessitando de ser reduzido até à forma amoniacal. Esta redução implica gastos energéticos. Desta forma, carboidratos de reserva da planta e as substâncias fotossintéticas,

não só disponibilizam esqueletos carbonados necessários para a incorporação do grupo amónio, como também a energia e o hidrogénio requerido para a redução. A redução do azoto nítrico a amoniacal ocorre em duas fases, na primeira ocorre a redução do ião nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a ião nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) catalisada pela enzima nitrato redutase (NR) e implicando o gasto de dois eletrões, e na segunda, o ião nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é reduzido a ião amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) pela enzima nitrito redutase (NiR) implicando o gasto de seis eletrões (Blaya & Garcia, 2000).

O poder redutor para o funcionamento da enzima NR advém de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) ou de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada). Consoante a fonte de poder redutor utilizada pela NR, esta pode ser dividida em três tipos: i) um que apenas utiliza como dador de eletrões a NADH, sendo o tipo mais comum, ii) um que utiliza a NADPH, que se encontra em tecidos “não verdes”, como por exemplo as raízes, iii) e outro que é capaz de vincular os dois tipos de poder redutor (Miller & Cramer, 2004; Maldonado, Agüera, & Vicente, 2000). De acordo com Mengel *et al.* (2001) existe um pequeno número de enzimas com a capacidade de utilizar os dois tipos de poder redutor.

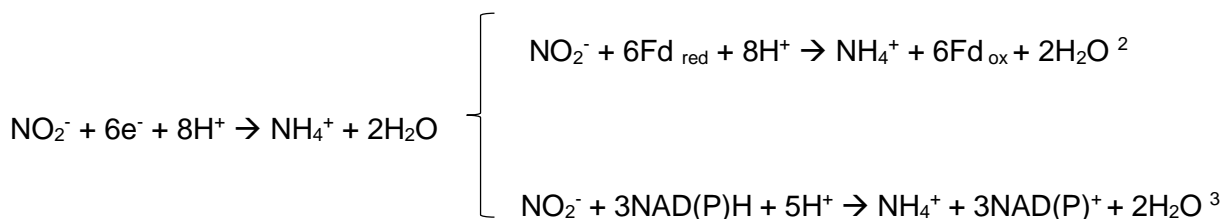
A nitrato-redutase está localizada no citosol das células e contém como grupos prostéticos um grupo heme (com ferro), uma flavina-adenina-dinucleótido (FAD) e um cofator molibdénio (MoCo) (Varennnes, 2003). Os eletrões subministrados pela NADH são transportados, através dos grupos FAD, heme e MoCo até ao ião nitrato que é reduzido a nitrito segundo a equação:



A NR está ausente em plantas que não recebem nitrito, sendo rapidamente induzida na presença do ião. O molibdénio (Mo) é um micronutriente anião essencial à atividade da nitrato-redutase. Este micronutriente encontra-se complexado por um tipo de pterina (metaloproteína) denominada molibdoproteína, formando o grupo prostético MoCo. É só nesta forma que o Mo se encontra ativo na planta sendo o MoCo o responsável pela atividade catalítica da nitrato-redutase. Os teores de Mo na planta estão diretamente correlacionados com a sua disponibilidade no solo, sendo que esta diminui em solos com pH elevado, causando deficiência na planta (Mendel, 2007). Nestas situações verifica-se uma acumulação de nitratos e a diminuição da concentração de aminoácidos e outros compostos azotados (Mengel & Kirby, 2001) devido à reduzida atividade da nitrato-redutase e consequente falta de amoníaco/amónio (Varennnes, 2003).

A segunda etapa da redução do nitrato ocorre nos plastídios, no protoplasto se for na raiz e nos cloroplastos se realizada nas folhas, pela enzima nitrito-redutase. Esta redução ocorre imediatamente a seguir à redução dos nitratos, pois os nitritos são tóxicos para as plantas quando se encontram em elevadas quantidades (Varennnes, 2003).

A nitrito-redutase é um monómero composto por dois grupos prostéticos, o centro sulfoférico (4Fe – 4S), e um siroheme. Esta enzima pode utilizar como dador de eletrões dois tipos de transportadores: uma proteína presente nos cloroplastos que contém ferro – ferredoxina; ou em menor expressão a NADPH presente nos protoplastos durante os períodos noturnos em que não há disponibilidade de ferredoxina. Ambos os dadores catalisam seis eletrões que reduzem o nitrito a amónio, segundo a equação (Taiz & Zeiger, 1991):



A redução do ião nitrato a ião amónio pode ter lugar nas raízes ou nas folhas. A proporção reduzida num e noutro local depende de vários fatores como o fornecimento exterior de nitrato, espécie vegetal, temperatura, idade da planta e presença de outros nutrientes. Quando a planta absorve pequenas quantidades de nitrato, a redução dá-se logo nas raízes requerendo um maior dispêndio de energia face à redução que ocorre nas folhas. Esta é mais económica devido ao poder redutor (NAD(P)H) e à energia necessária (ATP) derivarem diretamente da fotossíntese. Por isso, quando a intensidade luminosa é elevada, a redução do ião nitrato nas folhas não tem praticamente custos para planta (Varennnes, 2003).

Durante o dia, a redução do ião nitrato dá-se sobretudo nas folhas, quando há atividade fotossintética, havendo um aumento da taxa de redução em relação à assimilação de nitrato ao longo do dia, para aumentar novamente ao longo da noite devido à menor taxa de redução. O vulgar fenómeno de acumulação de nitratos nas plantas deve-se sobretudo à ausência de luminosidade e à diminuição do poder redutor na planta. A capacidade redutora das folhas é máxima quando estas estão em expansão. Numa folha completamente expandida a capacidade redutora é baixa, podendo haver acumulação de nitratos nos vacúolos, o que poderá prejudicar a nutrição da planta (Miller & Cramer, 2004; Varennnes, 2003).

---

<sup>2</sup> Equação da redução do nitrito a amónio mediada pelo dador de eletrões ferredoxina presente nos tecidos fotossintéticos. “Red” e “ox” descrevem a redução e a oxidação, respetivamente.

<sup>3</sup> Equação da redução do nitrito a amónio em tecidos “não verdes” utilizando o dador de eletrões NAD(P)H proveniente da respiração.

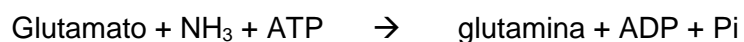
#### 2.3.4.2. Glutamina-sintetase

A glutamina-sintetase é uma proteína octamétrica considerada a enzima chave na assimilação do ião amônio presente nas raízes ou na parte aérea como resultado da redução do ião nitrato, da fixação biológica do azoto realizada por bactérias em simbiose com plantas como as leguminosas, e através da fotorrespiração que ocorre nos tecidos verdes (Varennnes, 2003).

Nas plantas superiores existem duas formas da GS: GS1 localizada no citosol com múltiplas isoformas e GS2 presente nos cloroplastos. A isoenzima GS1 está presente em todos nos tecidos vegetais de todas as plantas e participa na assimilação primária do ião amônio nas raízes e na remobilização do azoto durante a senescência das folhas. A isoenzima GS2 encontra-se em abundância nos tecidos fotossintéticos com um papel primordial na reassimilação do amônio derivado da fotorrespiração (Dragicevic *et al.*, 2014). Neste estudo, consideramos apenas a atividade total das duas formas de GS.

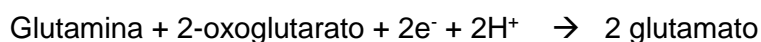
A sua função consiste em catalisar a reação de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  (ou melhor, o amoníaco com que se encontra em equilíbrio) em glutamina, utilizando o glutamato como substrato, processo que exige o consumo de ATP. O ATP advém da fosforilação fotossintética quando se trata da GS2 e da respiração na GS1 (Mengel & Kirby, 2001; Varennnes, 2003).

#### Glutamina-sintetase



O glutamato consumido é regenerado pela enzima glutamato 2-oxoglutarato amino transferase (GOGAT), também designada glutamato-sintetase, que vai transferir um grupo amina da glutamina para o 2- oxoglutarato (fornecido pelo ciclo de Krebs) dando origem a duas moléculas de glutamato (Mengel & Kirby, 2001; Varennnes, 2003).

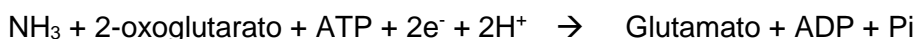
#### GOGAT



Existem duas formas da enzima GOGAT que diferem na origem do poder redutor. Uma utiliza o poder redutor da ferredoxina e a outra de NAD(P)H consoante o local onde se dá a reação, nos tecidos verde (GOGAT-Fd) ou nos tecidos não fotossintéticos (GOGAT-NAD(P)H (Mengel & Kirby, 2001).

A enzima glutamina-sintetase funciona em ciclo com a glutamato-sintetase (GOGAT), constituindo o ciclo GS/GOGAT, a principal via de assimilação do amoníaco nas plantas (Mifflin *et al.*, 2002 citado em Lopes, 2011).

## GS + GOGAT



Esta reação de assimilação de  $\text{NH}_3$  catalizada pela GS seguida de GOGAT representa a fase mais importante da assimilação do ião amônio tanto nas folhas como nas raízes, pois todos os aminoácidos e compostos azotados necessários à planta, como proteínas e ácidos nucleicos, formam-se a partir da glutamina e do glutamato (Mengel & Kirby, 2001; Varennes, 2003).

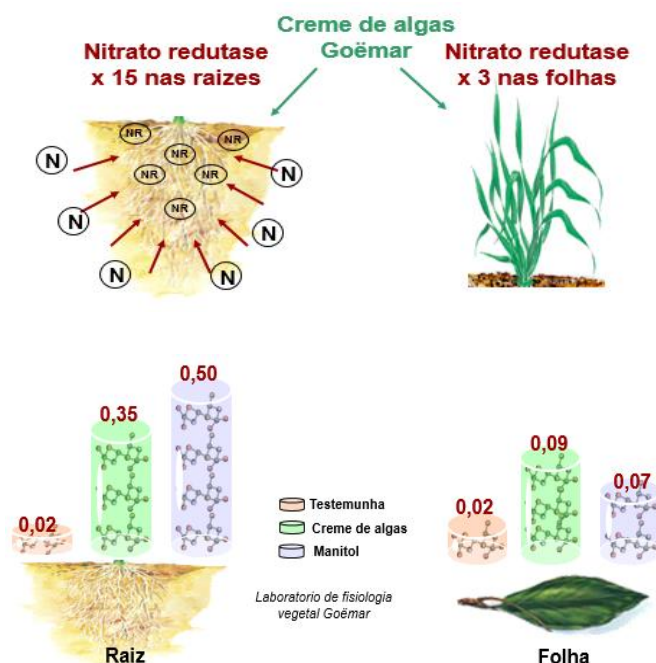
### 2.4. Utilização de um extrato de algas como bioestimulante

Os bioestimulantes são definidos, por muitos autores, como substâncias naturais ou sintéticas, oriundos da mistura de dois ou mais biorreguladores vegetais ou destes com outras substâncias (aminoácidos, nutrientes e vitaminas), que podem ser aplicados diretamente nas plantas ou em tratamento de sementes (Becker *et al.*, 2006; Ferreira Varanda *et al.*, 2013). Assim, procuram obter-se maiores produções e melhorias na qualidade das sementes. Estes biorreguladores favorecem a expressão do potencial genético das plantas, mediante alterações nos processos vitais e estruturais, promovem o equilíbrio hormonal e estimulam o desenvolvimento do sistema radicular (Castro e Vieira, 2001; Silva *et al.*, 2008; Ferreira Varanda *et al.*, 2013 citado em Soveral, 2014).

Os bioestimulantes foram dos primeiros recursos agrícolas a serem utilizados pela humanidade. No entanto, pouco foi feito para melhorar e aperfeiçoar as suas qualidades durante muitos anos. Durante a última década, foram feitos estudos para selecionar microrganismos benéficos e compostos bioativos para melhorar o desempenho da aplicação de bioestimulantes nas culturas. A sua aplicação favorece a nutrição vegetal facilitando a assimilação e translocação de nutrientes, aumenta a tolerância das plantas a stresses abióticos, incrementa o vigor, qualidade e rendimento e ajuda a promover o desenvolvimento de microrganismos benéficos no solo (European Biostimulants Industry Council, 2014).

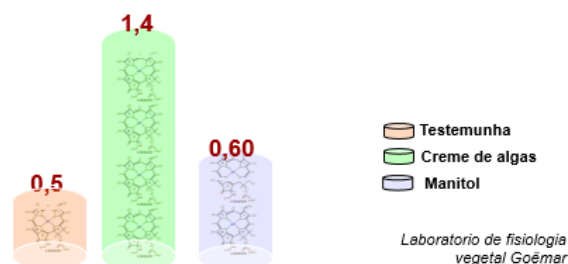
No estudo realizado, utilizou-se um bioestimulante produzido à base de extrato de algas que se encontra à venda no mercado com o nome Goëmar Olivos (Selectis). De acordo com o laboratório de fisiologia vegetal do fabricante, os produtos Goëmar promovem a absorção de nutrientes pelas culturas. Em ensaios realizados no campo, após 15 dias da aplicação do creme de algas, registaram-se aumentos de 11% no teor de N, 7% de S e 10% de Mg e Mn na cultura de trigo. No caso do Boro (B), elemento em relação ao qual a oliveira é relativamente exigente, a aplicação de Goëmar nas culturas de beterraba, girassol e ervilha, produziu aumentos de absorção do nutriente em 10, 5 e 14 % respetivamente. A razão por

detrás dos aumentos verificados é justificada pelo fabricante por o creme de algas possuir um composto ativo (manitol) que aumenta a atividade de uma enzima envolvida no metabolismo do azoto, a nitrato redutase (figura 11) (Lopes, 2011).



**Figura 11** - Efeito da aplicação do creme de algas na atividade da enzima nitrato redutase. Os valores apresentados são expresso em  $\mu\text{mol}$  de nitritos/ g de peso fresco (Goëmar - Laboratoire de la mer).

A aplicação do creme de algas demonstra influenciar o teor de clorofila, que comparativamente à testemunha apresenta uma grande diferença (figura 12). Esta diferença não se deve somente ao manitol, composto ativo com efeito na enzima nitrato redutase, mas também a outros compostos ativos presentes no bioestimulante, nomeadamente as betaínas, como a betaína ácido  $\gamma$ -aminobutírica, betaína ácido aminovalérica, e glicinabetaína, que são, no fundo, compostos, semelhantes às hormonas vegetais citocininas, que retardam a degradação da clorofila, mantendo o seu teor elevado e reduzindo a perda de atividade fotossintética (Blunden *et al.*, 1996 citado em Soveral, 2014).



**Figura 12** - Medida da atividade da clorofila total (em mg/g de peso fresco) (Goëmar - Laboratoire de la mer).

A nutrição fosfatada também é ativada pela aplicação do extrato de algas Goëmar, na medida em que aumenta a atividade das fosfatases, essenciais à extração do fósforo do complexo do solo (figura 13). O fósforo é um elemento essencial para a atividade energética da planta, no entanto apresenta-se pouco disponível na solução do solo, estando normalmente fixado sob a forma insolúvel no complexo do solo. A sua assimilação pelas raízes está condicionada à presença de fosfatases.



**Figura 13** - Ação do creme de algas sobre a enzima fosfatase (Goëmar - Laboratoire de la mer).

Segundo o fabricante, o creme de algas possui outras características, dando relevância ao número de poliaminas observado em plantas nas quais o produto foi aplicado. As poliaminas são componentes celulares cuja ação ainda não está claramente definida. Presume-se que tenham um importante papel em processos celulares como a replicação, a transcrição e a translocação. Em fruticultura, crê-se que as poliaminas são essenciais ao bom desenvolvimento da floração, fecundação e formação do fruto. A produção de poliaminas pela planta é crescente da floração até ao vingamento. As mais importantes e conhecidas são a putrescina, a espermidina e a espermina. Em ensaios realizados pelo fabricante, foram

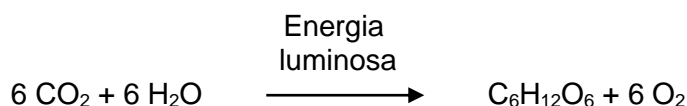


registados valores de 2,4 e 1,8 vezes superiores nas culturas de macieira e vinha respetivamente onde o produto foi aplicado (Goemar, Le Laboratoire de la Mer).

## **2.5. Importância da clorofila como indicador do teor de azoto na planta**

### **2.5.1. Fotossíntese**

Todas as formas de vida necessitam de energia para crescer e se desenvolver. As algas, plantas, árvores e alguns tipos de bactérias conseguem absorver a energia luminosa proveniente da radiação solar e utilizá-la para sintetizar materiais orgânicos. A fotossíntese é um processo biológico muito importante em que as plantas sintetizam compostos orgânicos a partir de materiais inorgânicos utilizando a luz como fonte de energia (Teixeira & Ricardo, 1983). A conversão de energia luminosa em energia química está diretamente relacionada com a conversão de CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos. Durante décadas, ambas as reações, conversão energética e fixação de CO<sub>2</sub>, foram consideradas uma única reação, descrita pela equação:



O termo em foco, a fotossíntese, está associado ao processo a partir do qual um sistema de pigmentos absorve radiação eletromagnética e converte-a em energia química disponível para o crescimento tendo em conta o ambiente envolvente (Bendall na Hill, 1968 citado em Mengel & Kirby, 1978).

As estruturas celulares providas de pigmentos específicos à sua função constituem o aparelho fotossintético. É no cloroplasto que este aparelho atinge o grau de máxima complexidade, sendo os pigmentos fotossintéticos (presentes nas membranas dos tilacoides) os principais responsáveis pela conversão da energia luminosa em energia química. Todos os organismos fotossintéticos possuem um ou mais pigmentos capazes de absorver luz visível. Esta conduzirá a excitações das moléculas dos pigmentos, iniciando-se assim as reações fotoquímicas da fotossíntese. Os três principais tipos de pigmentos envolvidos no fenómeno fotossintético são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas, sendo a clorofila *a* o único pigmento capaz de ceder, por ação da luz, os eletrões necessários ao desenrolar do processo fotossintético. Os restantes pigmentos absorvem radiação, de diversos comprimentos de onda, que concentram sobre o pigmento primário (clorofila *a*), daí se designarem por pigmentos acessórios ou auxiliares (Teixeira & Ricardo, 1983).

### **2.5.2. Síntese de clorofila**

A via metabólica que conduz à síntese de clorofila envolve numerosas reações químicas cuja ocorrência depende da presença de enzimas específicas. Estas enzimas são proteínas cuja síntese é controlada a nível genético. A ocorrência de mutações nos genes reguladores da síntese destas enzimas envolvidas na síntese de clorofila pode impedir a formação do pigmento. Exemplo desta ocorrência é o aparecimento de plantas desprovidas de clorofila (plantas albinas) nas sementeiras. As plantas albinas morrem, uma vez esgotadas as reservas da semente, pois não podem sintetizar novos hidratos de carbono essenciais ao seu desenvolvimento. A síntese de clorofila depende, também, de determinados elementos minerais como o ferro, o azoto e o magnésio. A deficiência destes minerais manifesta-se geralmente por uma clorose foliar. Embora o ferro não seja um constituinte da molécula de clorofila, a sua presença é essencial para a síntese do pigmento. Presume-se ser necessário à formação de proteínas associadas à estrutura lamelar do cloroplasto. A presença de azoto na molécula de clorofila explica a ocorrência de clorose em condições de deficiência do mesmo. Analogamente, sendo o magnésio um constituinte da clorofila, a falta deste mineral em concentrações adequadas dá origem a folhas cloróticas (Teixeira & Ricardo, 1983).

A deficiência no solo de outros minerais, tais como magnésio, zinco, potássio e cobre pode, eventualmente, conduzir a uma redução no teor em clorofila das plantas que nele se desenvolvem (Barranco *et al.*, 1999).

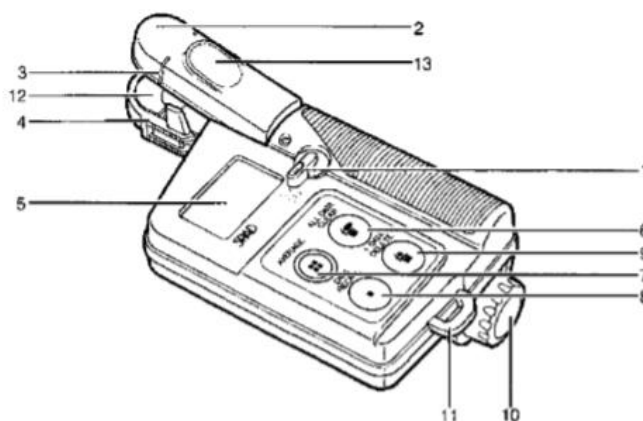
A disponibilidade de água e a temperatura desempenham um papel de certo relevo na síntese de clorofila. Normalmente, o teor em clorofila aumenta após chuvas abundantes e diminui durante os períodos de seca. Por outro lado, a saturação hídrica dos solos durante períodos de tempo relativamente longos conduz a uma redução da quantidade de clorofila nas folhas. Como acontece com a maioria dos compostos biológicos, a quantidade de clorofila presente nas plantas depende da taxa de síntese e da taxa de degradação do pigmento. A destruição de moléculas de clorofila esta associada a fatores internos e externos, sendo os nutrientes minerais o fator externo que traduz maior impacto, pois integram a estrutura molecular das plantas e estão envolvidos nas reações de síntese dos pigmentos (Teixeira & Ricardo, 1983).

### **2.5.3. Utilização do medidor de clorofila SPAD na oliveira**

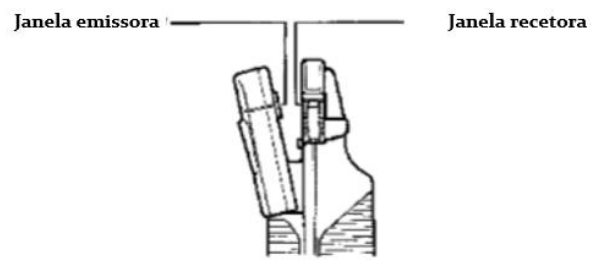
O aparelho de medição indireto do teor de clorofila Minolta SPAD-502 (*Soil Plant Analysis Development*) tem sido alvo de diversos estudos em varias culturas, manifestando resultados satisfatórios quanto à avaliação do estado nutricional de N (Zotarelli, 2003), sendo necessário ajustar a calibração do aparelho consoante o tipo de cultura e a situação a estudar. Vários

trabalhos têm demonstrado que a utilização do SPAD-502 ajuda a aferir a necessidade de adubação, nomeadamente de N, mas também de S, Fe e Mn, uma vez que intervêm na síntese de clorofila e manifestam clorose nas folhas quando estão em falta (Malavolta *et al.*, 1997).

O SPAD – 502 (figura 15) fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha. É constituído por dois LEDS que emitem radiações na ordem dos 650 nm (luz vermelha) e a 940 nm (radiação infravermelha). Para medir o teor de clorofila de uma folha, esta é colocada no centro da cabeça de medição (figura 15), fecha-se a mesma, a luz é emitida pela janela superior, ultrapassa a folha e é recebida na janela inferior por um recetor SPD (fotodíodo de silicone) que a converte em sinal elétrico analógico (Spectrum Technologies, Inc., 2009). A absorvância das moléculas de clorofila é muito eficiente a 650 nm, mas é desprezível a 940 nm (Minolta, 1969 citado em Jesus & Marengo, 2008). Deste modo, o sinal derivado da medição a 650 nm é utilizado como base para o cálculo do teor de clorofila e o sinal da medição a 940 nm é utilizado como fator de correção para compensar a absorção de fótons por moléculas de tecido foliar desprovidas de clorofila a 650 nm (Jesus & Marengo, 2008).



**Figura 14** - Ilustração do equipamento SPAD - 502. 1- Botão ligar/ desligar; 2- Cabeça de medição; 3 - Linha de alinhamento central; 4 - Indicador de máxima profundidade; 5 - Painel LCD; 6- Botão de cálculo da média; 7- Botão de eliminação de dados; 8 - Botão que permite visualizar a última leitura; 9 – Botão de eliminação da última leitura; 10 – Bateria; 11- Acessório para facilitar a portabilidade; 12 – Janela de leitura; 13 – Local para colocar o dedo indicador (adaptado de Spectrum Technologies, Inc., 2009)



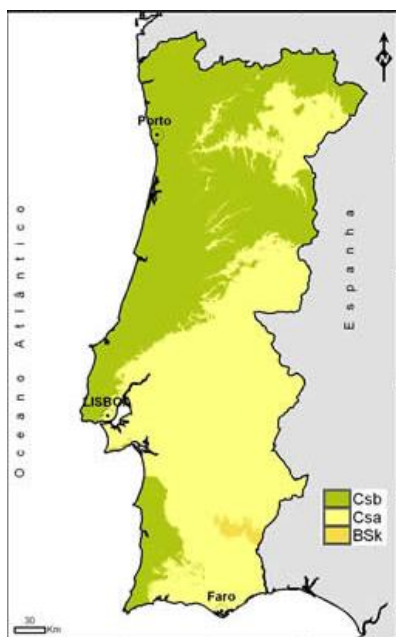
**Figura 15** - Iluminação e medição através do SPAD – 502 (adaptado de Spectrum Technologies, Inc., 2009)

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Local de ensaio

Os ensaios de campo realizaram-se em Santarém, na freguesia de Azóia de Baixo, na Quinta Vale de Lobos (39°17'N, 8°41'W). A exploração tem como principal atividade agrícola a produção de azeitona para o fabrico de azeite de marca própria e para venda a granel. O olival é super-intensivo ocupando na totalidade 75 ha, com orientação N-S. A parcela utilizada no ensaio tem apenas árvores da cv. Arbequina e cv. Cobrançosa, plantadas entre 1999 e 2001, que se encontram intercaladas por linhas. Apresentam compassos de 3,5m x 1m e a topografia do terreno apresenta um ligeiro declive de 2-3%. É um olival de regadio, cuja rega gota-a-gota é feita por gotejadores distanciados 1 m entre si e com débitos de 2 l/hora. Relativamente à fertilização no olival, não foi possível obter dados do ano de 2013, devido a mudanças logísticas na exploração.

##### 3.1.1. Características climáticas



**Figura 16** - Classificação climática de Köppen-Geiger (adaptado de IPMA, 2015)

Santarém encontra-se inserida numa região de clima temperado, sem quedas regulares de neve, com Verões quentes e secos e Invernos com precipitações moderadas. Segundo a classificação climática de *Köppen*, atribui-se o código Csa (figura16), que corresponde a um clima mesotérmico (temperado), com estação seca durante o Verão, temperatura média do ar no mês mais quente, superior a 22°C, enquanto a do mês mais frio está compreendida entre os 0 e 18°C; a quantidade de precipitação no mês mais seco é inferior a um terço da do mês mais chuvoso do semestre frio e inferior a 40 mm. Pela classificação de *Thornthwaite*, o clima da região é descrito por C<sub>1</sub>B<sub>2</sub>sa', o que significa que é sub-húmido seco (índice hídrico compreendido entre -20°C e 0%), mesotérmico (evapotranspiração potencial no ano 712 a 855 mm), com índices de humidade entre os 10 e os 20% e com eficácia térmica, no Verão, inferior a 48% (IPMA, 2015).

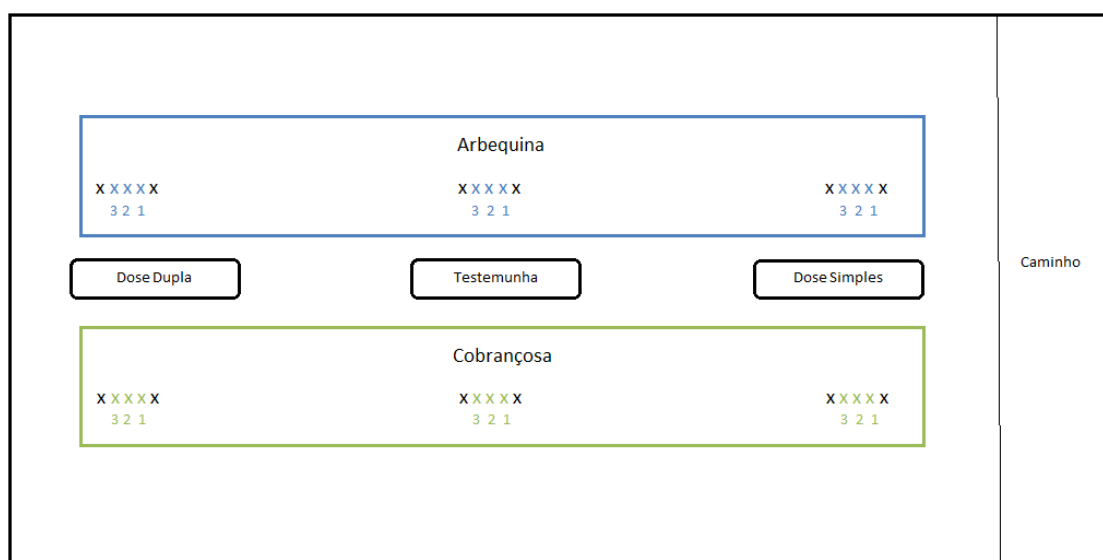
### 3.1.2. Características do solo

Em relação ao solo, este pode ser classificado pela World Reference Base of Soil Resources (WRB) (Allen *et al.*, 1998) como Cambissolos cálcicos. Estes solos são geralmente pouco desenvolvidos e com um horizonte B incipiente. São pouco profundos e apresentam uma permeabilidade muito baixa. A grande desvantagem destes solos é a sua susceptibilidade à erosão que pode causar sulcos. O facto de apresentarem um alto teor de calcário pode ser um problema para algumas culturas, não sendo preocupante para a oliveira.

## 3.2. Material vegetal

### 3.2.1. Caracterização do material vegetal

Foram seleccionadas 9 árvores de cada cultivar, Arbequina e Cobrançosa, as quais foram divididas em 3 modalidades: testemunha (sem aplicação de bioestimulante), com dose simples e dupla de bioestimulante (ver 3.3). No total foram utilizadas 18 árvores dispostas em linhas seguidas. A escolha das árvores teve por base a preocupação de todas apresentarem um bom estado fitossanitário, localização próxima entre exemplares e de não prejudicar o plano normal de operações executadas no olival (figura 17).



**Figura 17** – Esquema representativo do local de ensaio na Quinta Vale de Lobos.

Para os ensaios enzimáticos foram recolhidas amostras de folhas (uma amostra/árvore) e estruturas reprodutivas (uma amostra/árvore), semanalmente, tendo sido acondicionadas em folhas de papel de alumínio devidamente identificadas e mantidas em gelo

num recipiente para transporte (figura 18 e 20). No laboratório, as amostras de folhas foram lavadas, pesadas em fresco e secas com papel absorvente (figura 19). Utilizaram-se 400 mg de folhas e estruturas reprodutivas (inflorescências, flores ou frutos recém-vingados). As amostras foram depois sujeitas a um choque térmico com azoto líquido e conservadas a -70 °C, até à realização da extração de proteínas.










**Figura 18, 19 e 20** - Amostras em folhas de papel de alumínio mantidas em gelo durante o transporte. Lavagem de folhas para serem pesadas em fresco. Exemplo de amostragem de pequenos frutos.

### 3.2.2. Evolução dos estados fenológicos

#### 3.2.2.1. 'Arbequina'


**Quadro 1** - Datas de colheita de amostras e respetivos estados fenológicos da cultivar Arbequina. Escala de BBCH (adaptada de Sanz-Cortés *et al.*, 2002).

1ª Colheita 09-05-2013	Estado 60 Abertura das primeiras flores	
2ª Colheita 16-05-2013	Estado 65 Plena floração: pelo menos 50% das flores estão abertas	







3ª Colheita 23-05-2013	Estado 67 As pétalas brancas começam a cair	
4ª Colheita 30-05-2013	Estado 69 Fim da floração, vingamento dos frutos e abscisão dos ovários não fecundados	
5ª Colheita 06-06-2013	Estado 71 Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final	
6ª Colheita 14-06-2013	Estado 71 Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final	
7ª Colheita 20-06-2013	Estado 75 Frutos com aproximadamente 50 % do seu tamanho final. Inicia-se o endurecimento do endocarpo (o fruto apresenta resistência ao corte)	

### 3.2.2.2. 'Cobrançosa'

**Quadro 2** - Datas de colheita de amostras e respetivos estados fenológicos da cultivar Cobrançosa. Escala de BBCH (adaptada de Sanz-Cortés *et al.*, 2002).

1ª Colheita 09-05-2013	Estado 60 Abertura das primeiras flores	
---------------------------	---	--



2ª Colheita 16-05-2013	Estado 65 Plena floração: pelo menos 50% das flores estão abertas	
3ª Colheita 23-05-2013	Estado 67 As pétalas brancas começam a cair	
4ª Colheita 30-05-2013	Estado 69 Fim da floração, vingamento dos frutos e abscisão dos ovários não fecundados	
5ª Colheita 06-06-2013	Estado 71 Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final	
6ª Colheita 14-06-2013	Estado 71 Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final	
7ª Colheita 20-06-2013	Estado 75 Frutos com aproximadamente 50 % do seu tamanho final. Inicia-se o endurecimento do endocarpo (o fruto apresenta resistência ao corte)	

### **3.3. Aplicação do Bioestimulante**

O produto utilizado nestes ensaios foi um bioestimulante à base de um creme de algas enriquecido com Magnésio (37 g/l de MgO), Boro (26 g/l), enxofre na forma solúvel (73 g/l SO<sub>3</sub>) e Azoto (41 g/l). A sua aplicação foi feita por via foliar. A modalidade simples compreendeu duas aplicações, a primeira no fim do repouso (6 de março de 2013, 2,5l/ha, de acordo com a norma do fabricante) e a segunda na plena floração (14 de maio de 2013, na mesma concentração). A dose dupla compreendeu uma única aplicação, à plena floração (dia 14 de maio de 2013, 5l/ha). Na modalidade testemunha foram feitas duas aplicações com água, uma em cada data.

### **3.4. Ensaio enzimático**

#### **3.4.1. Preparação do extrato de reação**

A fim de analisar a atividade das enzimas NR e GS preparou-se um extrato do material vegetal. Para tal utilizou-se um almofariz para moer as folhas e flores/frutos recolhidos semanalmente no local de ensaio, recorrendo à utilização de N<sub>2</sub> líquido de forma a minimizar a degradação dos tecidos. Para a preparação do extrato, foi elaborada uma solução tampão de extração formada por 50mM de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) com pH 7,5, 2mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 1,5% (w/v) de caseína solúvel, 2mM de ditioneitol (DTT) e 1% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP insolúvel). Utilizaram-se tubos de 1,5 ml para colocar 1 ml de solução tampão de extração e 7,5 µl de mercaptoetanol (antioxidante). De seguida adicionou-se a cada tubo o material vegetal, previamente moído, e centrifugou-se a 3000 rpm, durante 5 min e a uma temperatura de 4°C. Retirou-se o líquido sobrenadante e submeteu-se a uma nova centrifugação a 13 000 rpm, durante 15 min a 4°C. Após centrifugadas as amostras, retirou-se novamente o sobrenadante, colocou-se em tubos de 1,5 ml, os quais foram submetidos a um banho de N<sub>2</sub> líquido e armazenados no congelador a -80 °C.

As extrações do material vegetal foram posteriormente utilizadas para a quantificação de proteínas solúveis, utilizando o método de Bradford, bem como para a quantificação da atividade das enzimas Nitrato redutase e Glutamina sintetase.

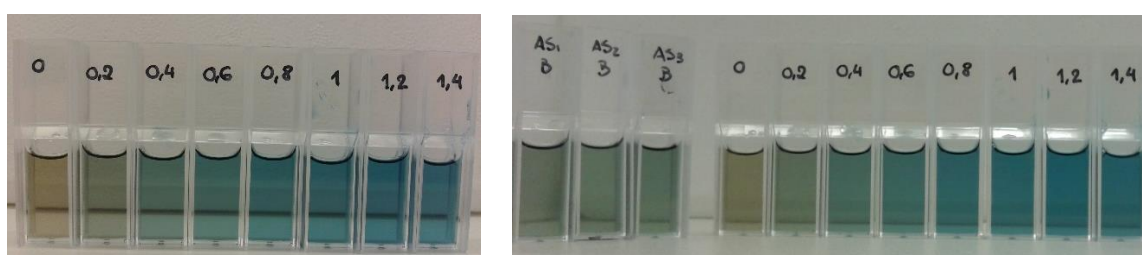
### 3.4.2. Quantificação proteica

A quantificação do teor de proteínas solúveis foi feita através do método de Bradford (1976), o qual se baseia no processo de detecção colorimétrica.

Primeiramente elaborou-se o reagente Bradford. Para tal, dissolveu-se 100mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 ml de etanol a 95% e adicionou-se 100 ml de ácido fosfórico a 85% (w/v). Completou-se o volume para 1l e agitou-se até o corante estar completamente dissolvido. Posteriormente filtrou-se a solução utilizando papel de filtro, ficando armazenada a 4°C.

A curva padrão foi preparada fazendo reagir 20 µl de solução padrão BSA (albumina sérica de bovino) com diferentes concentrações, 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4 mg/ml com 1 ml do reagente Bradford, medindo-se as absorvâncias a 595 nm (figura 21). A curva permitiu a conversão das absorvâncias registradas a mg de proteína por ml, ou seja, a sua concentração de proteína solúvel.

Para a determinação das proteínas nas amostras, colocou-se 20 µl dos extratos vegetais dos órgãos florais e foliares das cultivares Arbequina e Cobrançosa em tubos Eppendorf de 2ml e adicionou-se 1 ml do reagente Bradford, preparado previamente. Transferiram-se as reações para cuvetes e mediram-se as absorvâncias no espectrofotômetro a 595 nm (figura 22).



**Figura 21 e 22** - Curva padrão BSA. Exemplo de soluções da cultivar Arbequina com extratos vegetais foliares da modalidade simples, prontas para serem lidas no espectrofotômetro.

### 3.4.3. Quantificação enzimática

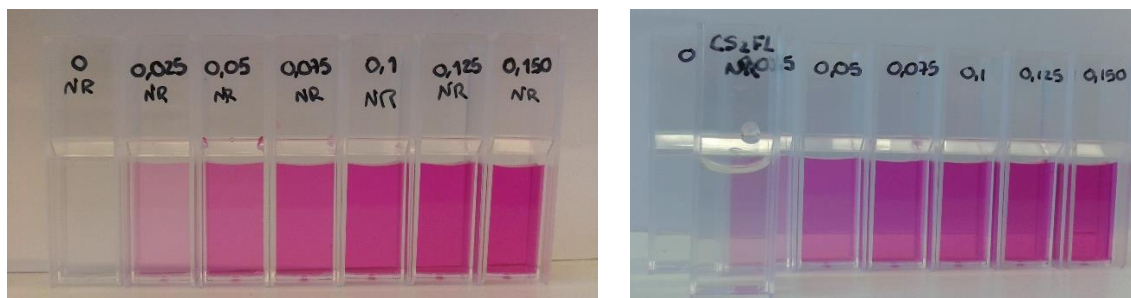
#### 3.4.3.1. Nitrato redutase

A atividade da Nitrato redutase foi quantificada com base no protocolo elaborado por Kaiser e Lewis (1984), registrando uma alteração no tempo de incubação em banho-maria a 28°C de 15 minutos para 18 horas.

Com base no protocolo, em cada tubo de Eppendorf de 2 ml, colocou-se 25 µl de tampão fosfato de potássio 10mM com pH 7,5, 25 µl de Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido (NADH) 1mg/ml, 50 µl de Nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) 0,1M e 350 µl de água destilada. Após a preparação dos respectivos tubos, adicionou-se 50 µl do substrato vegetal, das cultivares Arbequina e Cobrançosa, tanto dos órgãos foliares como dos órgãos reprodutores. De seguida foram incubados em banho-maria durante 18 horas a uma temperatura de 28°C. Após este período, a reação foi parada através de uma reação 1:1 de 250 µl de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED) a 0,02% (w/v) e de 250 µl de sulfanilamida a 1% (w/v) dissolvida em ácido clorídrico 1,5M. As soluções foram transferidas de tubos para cuvetes, permitindo desta forma, a leitura no espectrofotómetro a 540 nm do nitrito formado através dos valores das absorvâncias.

Para avaliar a quantidade de nitrito formado, foi elaborada uma curva de calibração, baseada em diferentes concentrações, previamente conhecidas, de uma solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). As concentrações padronizadas variaram entre 0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125 e 0,150 mM (figura 23).

Após a elaboração da reta de calibração e tendo por base os valores medidos no espectrofotómetro a 540nm (figura 24), substituiu-se os respetivos valores na reta e obteve-se a quantidade de nitrito formado (µmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) por proteína total (mg), obtendo-se assim a atividade enzimática da Nitrato redutase.



**Figura 23 e 24** - Curva padrão da NR. Exemplo de uma solução da cultivar Cobrançosa com extratos vegetais dos órgãos reprodutores da modalidade simples, prontas para serem lidas no espectrofotómetro.

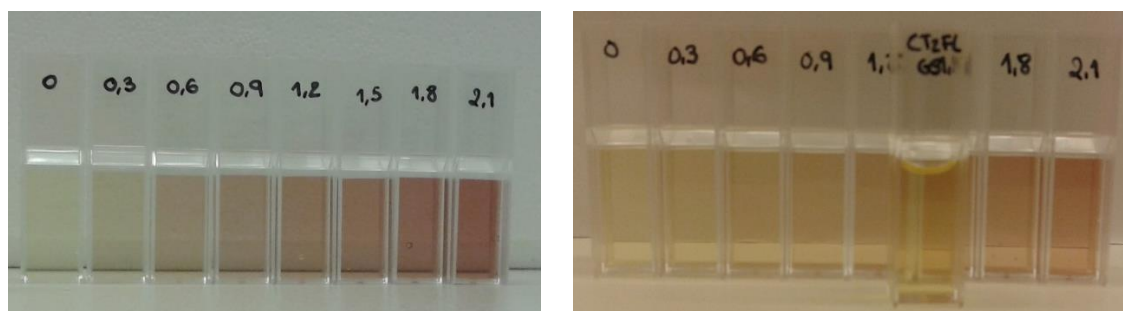
### 3.4.3.2. Glutamina sintetase

A atividade enzimática da glutamina sintetase foi baseada no método de Kaiser & Lewis (1984).

Preparou-se uma solução prévia de substrato da glutamina sintetase formada por 184  $\mu\text{mol}$  de ácido glutâmico, 90  $\mu\text{mol}$  de sulfato de magnésio, 12  $\mu\text{mol}$  de hidroxilamina, 100  $\mu\text{mol}$  de imidazole e 36  $\mu\text{mol}$  de ATP. Posteriormente e utilizando tubos de Eppendorf de 2 ml, transferiu-se 900  $\mu\text{l}$  da solução preparada para os respectivos tubos e adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  dos substratos vegetais das amostras das cultivares Arbequina e Cobrançosa. As soluções foram incubadas em banho-maria a 30°C durante 15 minutos. Após o período de incubação a reação foi parada com recurso a 500  $\mu\text{l}$  de reagente cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_2$ ) formado por 4 g de ácido tricloroacético, 3,2 g de cloreto de ferro e 100 ml de HCl 0,5M. Seguidamente as reações foram submetidas a uma centrifugação a 8000 rpm durante 5 minutos e transferidas para cuvetes de forma a possibilitar a leitura das absorvâncias referentes ao glutamil-hidroxamato formado, no espectrofotómetro, a 500nm.

A curva padrão foi elaborada com base em soluções de concentrações previamente conhecidas de uma solução de glutamil-hidroxamato 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 e 2,1 mM (figura 25).

Após realizada a curva padrão e medidos os valores das absorvâncias referentes ao glutamil-hidroxamato formado, substituiu-se os valores na reta de regressão e obteve-se a atividade enzimática da GS expressa em  $\mu\text{mol}$  glutamil-hidroxamato por mg de proteína total (figura 26).



**Figura 25 e 26** - Curva padrão da GS. Exemplo de uma solução da cultivar Cobrançosa com extratos vegetais dos órgãos reprodutores da modalidade testemunha, prontas para serem lidas no espectrofotómetro.

### **3.5. Medições do teor de clorofila**

As medições do teor de clorofila foram feitas com o aparelho portátil SPAD-502 e destinaram-se a avaliar a possível correlação entre o teor de clorofila e a aplicação do bioestimulante. Para cada uma das variedades, Cobrançosa e Arbequina, procedeu-se à leitura do teor de clorofila elegendo as mesmas árvores do ensaio enzimático consoante a modalidade: testemunha, dose simples e dose dupla de bioestimulante foram selecionadas três árvores nas quais se realizou dez medições em ramos do ano desde o topo da copa, folhas mais interiores a exteriores. Cada folha foi submetida a duas medições, uma no lado esquerdo da nervura e outra no lado direito.

Não se efetuou a extração de clorofila, que iria permitir comparar os valores de SPAD (medição indireta) com os teores extraídos de clorofila das folhas (método direto) devido à dificuldade na realização de cromatografia.

Nas duas variedades realizaram-se quatro medições ao longo do ensaio, nas datas de 09, 16, 23 e 30 de maio de 2013.

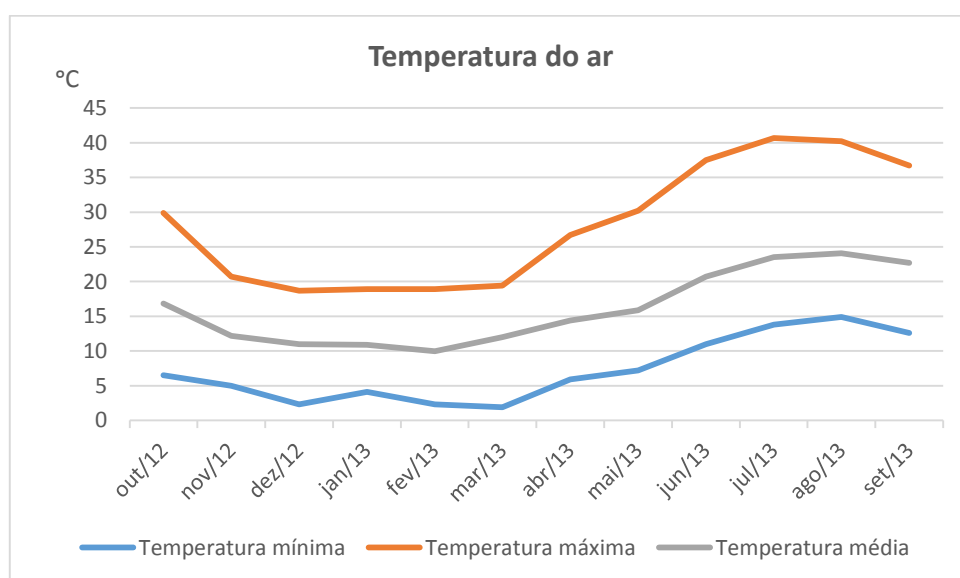
### **3.6. Análise estatística**

Os resultados das atividades enzimáticas dos órgãos foliares e reprodutores bem como a leitura do teor de clorofila a partir das folhas, foram tratados estatisticamente, recorrendo ao software Statistix 9, a um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . O tratamento foi realizado, separadamente, nas duas variedades. No que se refere aos ensaios enzimáticos, foram feitas análises de variância para cada uma das datas, comparando, para cada variedade e tipo de órgão, as modalidades testemunha, com dose simples e dupla de bioestimulante, e em cada órgão foram testadas as diferenças entre os tratamentos ao longo do período estudado. No ensaio de avaliação do teor de clorofila foram feitas análises de variância para cada uma das datas, comparando, para cada variedade as modalidades testemunha, com dose simples e dupla de bioestimulante. Nos casos em que se verificaram diferenças significativas nas análises de variância ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ), procedeu-se ao teste de Tukey, de modo a possibilitar uma comparação de médias.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Dados climáticos

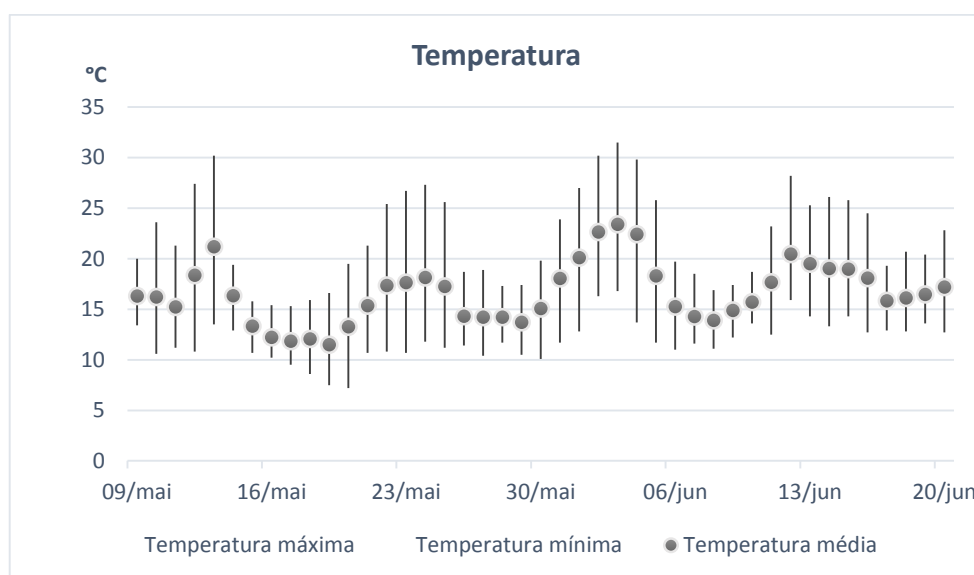
Os dados climáticos analisados provêm de uma estação meteorológica distanciada do local do ensaio aproximadamente 3,2 Km e compreendem o período de outubro de 2012 a setembro de 2013. A temperatura máxima registrada no período em análise foi de 40,7 °C correspondente ao mês de julho e a temperatura mínima ocorreu no mês de março chegando a 1,9 °C. No ano de 2013 as temperaturas máximas nos meses de junho a setembro registraram valores elevados entre 36,7 °C e 40,7 °C, o que para a oliveira pode implicar alguns danos. Acima de 35°C a oliveira regula a sua temperatura mediante o fecho dos estomas, que pode levar a uma diminuição da taxa de desenvolvimento. Considerando as temperaturas mínimas, os valores verificados não são prejudiciais ao normal desenvolvimento da oliveira. A temperatura média do ar verificada no período atingiu o valor máximo no mês de agosto (24 °C) e o valor mínimo no mês de fevereiro (10 °C). Um desenvolvimento vegetativo ótimo, na oliveira, manifesta-se com temperaturas compreendidas entre os 12°C e os 22°C, valores estes, que abrangem a média das temperaturas ao longo do período de outubro de 2012 a setembro de 2013 (figura 27).



**Figura 27** - Gráfico das temperaturas média, máxima e mínima mensais registradas no período de outubro de 2012 a setembro de 2013

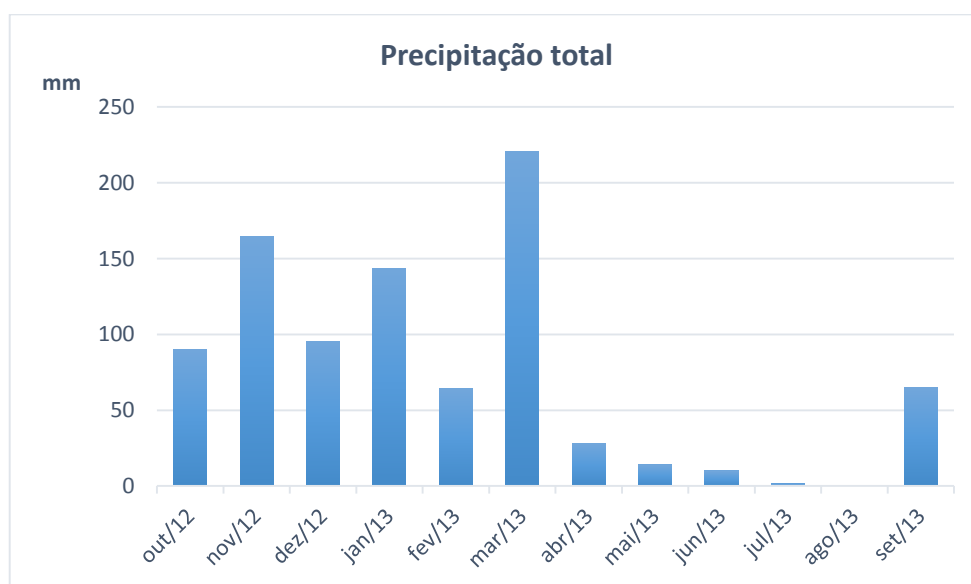


A figura 28 evidencia as temperaturas médias, máximas e mínimas desde a 1ª data de recolha de amostras, dia 9 de maio, até à última data de colheita, dia 20 de junho. As oscilações de temperatura variaram entre 7,2 °C e 31,5 °C.



**Figura 28** - Gráfico das temperaturas máxima, média e mínima diárias registadas ao longo do período de colheita de amostras de material vegetal para o ensaio.

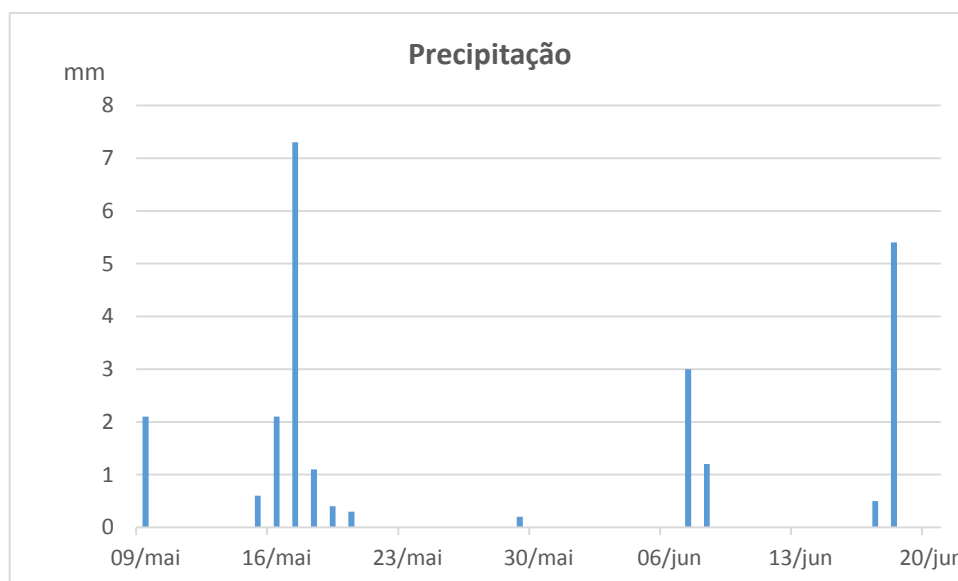
Juntamente com a variável climática da temperatura, também a variável precipitação tem importância na avaliação climática no período de outubro de 2012 a setembro de 2013. A figura 29 revela um máximo de precipitação no mês de março (220 mm) e um mínimo no mês de agosto, que não registou ocorrência de chuva.



**Figura 29** - Gráfico da precipitação total mensal no período de outubro de 2012 a setembro de 2013

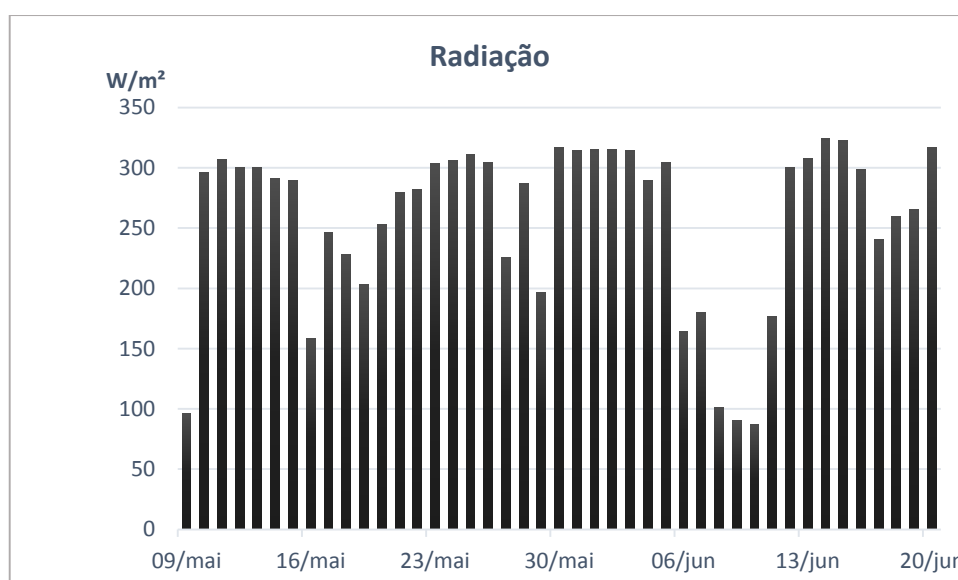


A figura 30 representa a pluviometria registada no período de colheita de amostras com a devida identificação das datas de colheita.



**Figura 30** - Gráfico da precipitação total diária registada ao longo do período de colheita de amostras de material vegetal para o ensaio.

Os valores de radiação verificados durante o período de ensaio estão representados na figura 31.



**Figura 31** - Gráfico da radiação média registada ao longo do período de colheita de amostras de material vegetal para o ensaio.

#### **4.2. Determinação da atividade enzimática da NR e GS nas folas e órgãos reprodutores de 'Arbequina' e 'Cobrançosa'**

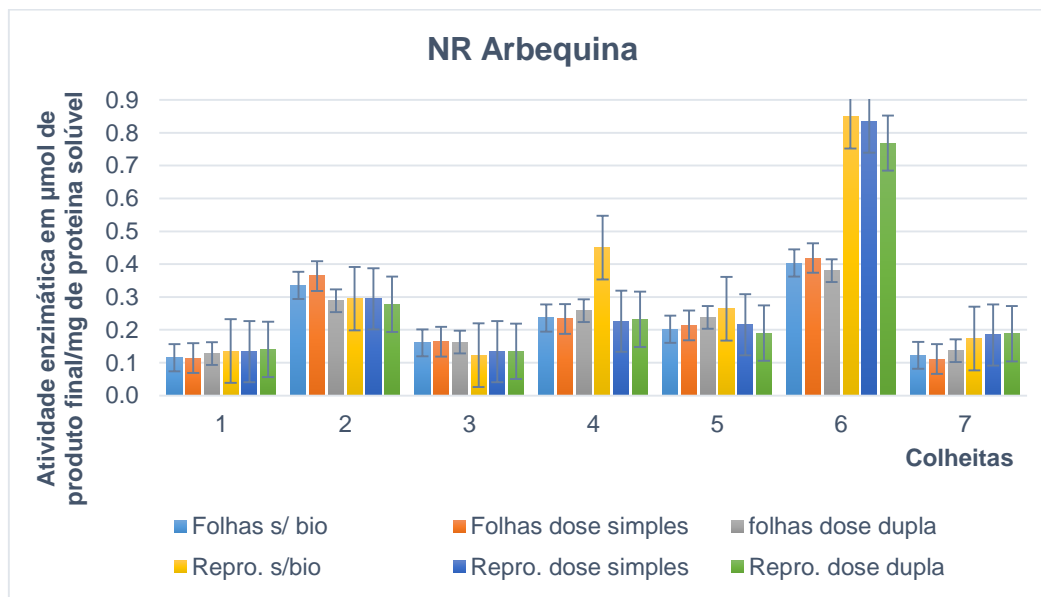
As determinações enzimáticas realizaram-se com material vegetal colhido entre maio e junho de 2013, tendo-se efetuado 7 colheitas com uma periodicidade semanal. As amostras foram recolhidas de órgãos foliares e órgãos reprodutores (inicialmente flores e nas últimas datas pequenos frutos vingados) de oliveiras de três modalidades: sem bioestimulante, com dose simples de bioestimulante (2 aplicações, 2,5 l/ha cada) e dose dupla de bioestimulante (uma única aplicação, 5 l/ha). Procurou-se com o ensaio analisar a atividade enzimática da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) quando as oliveiras foram submetidas à aplicação de bioestimulante, a fim de verificar se o mesmo permitia o aumento da atividade enzimática da GS e verificar o efeito do manitol, presente no creme de algas, na atividade da NR. Salienta-se o fato deste ensaio não utilizar amostras de raízes para a quantificação enzimática devido à dificuldade no processo de extração.

Relativamente aos protocolos utilizados durante o ensaio, efetuou-se uma alteração num dos procedimentos de determinação da atividade da NR elaborado por Kaiser e Lewis (1984). O período de incubação seria de 15 min para *Helianthus annuus L.* e, com base em estudos anteriores em oliveira, aumentou-se este para 18 horas, pois verificou-se que com um período mais alongado se conseguia chegar a valores detetáveis da NR.

Os dados resultantes da atividade enzimática da NR e GS foram submetidos a uma comparação estatística, através de uma análise de variâncias, designada ANOVA. Primeiramente para cada data de colheita, comparou-se as modalidades (testemunha, dose simples e dupla) com 2 tipos de amostra recolhida (folhas e órgãos reprodutores), de forma a avaliar a importância de aplicação de bioestimulante em dose simples, dupla ou simplesmente a não aplicação. Em segundo, para cada modalidade, comparou-se os 2 tipos de órgãos colhidos (foliar ou reprodutor) ao longo das datas de colheita, para estudar o possível efeito da aplicação de bioestimulante nas folhas e órgãos reprodutores à medida que a fenologia avança. As análises de variância foram elaboradas com 95 % de confiança de forma a avaliar a existência de diferenças significativas ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Nos casos em que tal se verificou, foi feito um teste de comparação de médias, designado teste de Tukey. Os resultados das ANOVA encontram-se no Anexo I.

#### 4.2.1. 'Arbequina'

Para a cultivar Arbequina, a atividade enzimática da NR apresenta dois picos, na 2ª e 6ª datas, em que os valores se distanciam significativamente das restantes datas de colheita (figura 32). Observando em cada data o comportamento da NR, este não manifesta grandes oscilações, exceto na 4ª data, em que se verifica uma atividade substancialmente superior a todas as outras, referente aos órgãos reprodutores sem a aplicação de bioestimulante. Na 6ª data também se nota uma grande discrepância entre a atividade da NR nas folhas e nos órgãos reprodutores, sendo bastante maior, nos últimos. Analisando a NR nas folhas, verifica-se que a dose dupla de bioestimulante, apresenta valores tendencialmente superiores aos das outras modalidades em quase todas as datas de colheita, excetuando na 2ª e 6ª, cuja dose simples, apresenta nestas datas média de atividade superiores de NR. Para os órgãos reprodutores observa-se uma grande oscilação entres as modalidades em estudo, sendo a ausência de bioestimulante a que manifesta uma evolução maior na maioria das datas de colheita (2ª, 4ª, 5ª, e 6ª datas), e a aplicação de dose dupla do extrato de algas nas restantes datas.

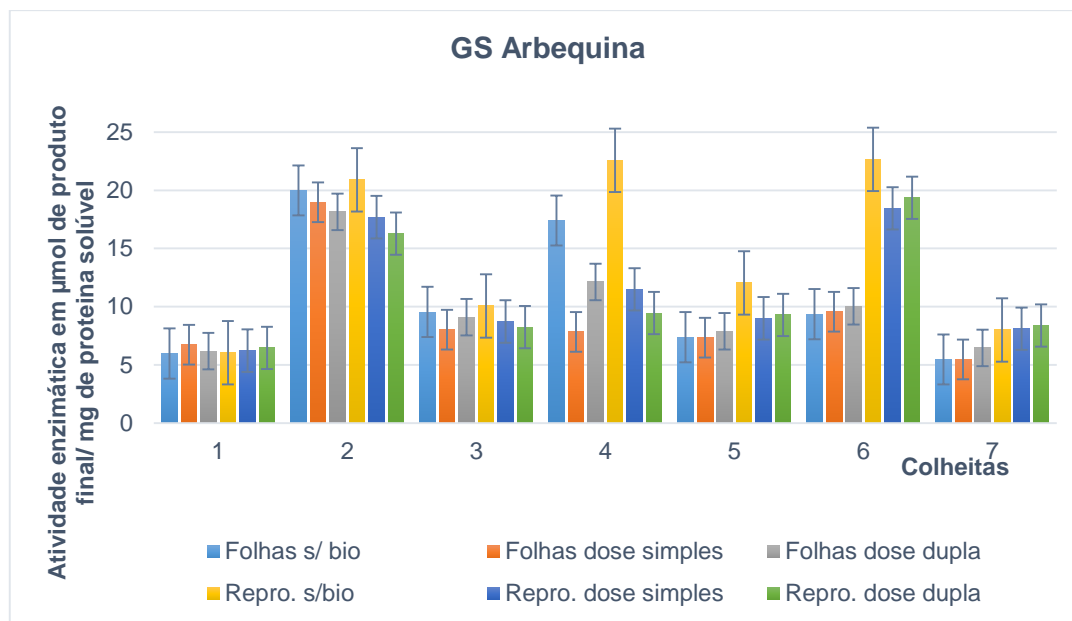


**Figura 32** - Atividade média da enzima NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Arbequina nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas é o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com

aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante.

A atividade enzimática da GS (figura 33) apresenta um pico na 2ª data de colheita, tanto nas folhas como nos órgãos florais e na 6ª data visualiza-se um aumento considerável na atividade nos pequenos frutos. Ao analisarmos a figura, verificam-se grandes oscilações nos valores das médias das atividades enzimáticas dentro da mesma data, no entanto, não são consideráveis uma vez que não mostram existir diferenças significativas nas modalidades. Tendencialmente, a ausência de bioestimulante e a dose dupla manifestaram na maioria das datas de colheita valores superiores à aplicação de dose simples, que apenas foi superior nas folhas na 1ª amostragem.

Nas três modalidades estudadas verificaram-se os maiores picos de atividade enzimática da NR e GS na 2ª e 6ª datas. O primeiro pico acontece na data após a plena floração (16-05-2013) e o segundo (14-06-2013) na fase em que já existem frutos com aproximadamente 10% do seu tamanho final. Após a plena floração, ou seja, após a germinação do tubo polínico e fecundação do óvulo, os tecidos florais começam a evoluir para a formação do fruto, tornando-se assim uma estrutura em constante consumo de nutrientes, entre os quais, o azoto. Esta razão pode levar ao aumento da atividade tanto nas folhas como nos órgãos reprodutores durante a 2ª data de recolha de amostras. Na 6ª data, o pico de atividades da NR e GS está direcionado para os órgãos reprodutores. A árvore começa a aumentar a carga de frutos vingados, necessitando de direcionar as formas de N assimilado pelas zonas *source*, as folhas, para as zonas *sink*, os pequenos frutos e crescimento de novos ramos.



**Figura 33** - Atividade média da enzima GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Arbequina nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas é o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante.

Compilando os resultados obtidos na análise de variância nas datas de colheita, verificaram-se diferenças significativas apenas na atividade da GS na 4ª data. Nas folhas a modalidade testemunha foi significativamente superior à dose simples que, por sua vez, também foi superior à dose dupla (quadro 3). Nos órgãos reprodutores verificou-se que as árvores não tratadas apresentaram diferenças significativas das árvores tratadas. Com base no teste de Tukey, pode-se verificar que para as folhas a aplicação de bioestimulante afeta significativamente e negativamente a atividade da GS à medida que a dose aplicada vai aumentando. Para os órgãos reprodutores, também a aplicação do bioestimulante traduz-se num decréscimo da atividade enzimática da GS (Anexo I). A aplicação do extrato de algas pode limitar a atividade da GS, uma vez que restringe a mesma de utilizar formas de azoto amoniacal provenientes diretamente do solo em vez de derivarem da degradação do ião nitrato por parte da NR.

Nas restantes datas de colheita, as amostras de folhas e órgãos reprodutores não manifestam diferenças significativas entre as modalidades estudadas, ou seja, a ausência de

bioestimulante como a aplicação do mesmo em dose simples ou dupla não afeta a atividade enzimática da GS e NR.

**Quadro 3** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o efeito de cada modalidade em cada data de colheita para a cultivar Arbequina. ( $\alpha = 0,05$ ) (\*a sombreado salientam-se os *p-value* inferiores ao nível de significância).

Colheitas	Arbequina	<i>p-value</i>	
		NR	GS
1ª 09 de maio	Folhas	0.1795	0.7221
	Órgãos reprodutores	0.7675	0.9424
2ª 16 de maio	Folhas	0.3317	0.8535
	Órgãos reprodutores	0.8955	0.3584
3ª 23 de maio	Folhas	0.9380	0.1528
	Órgãos reprodutores	0.5551	0.5138
4ª 30 de maio	Folhas	0.3797	0.0009
	Órgãos reprodutores	0.0690	0.0109
5ª 06 de junho	Folhas	0.3532	0.7524
	Órgãos reprodutores	0.1883	0.3089
6ª 14 de junho	Folhas	0.1392	0.6906
	Órgãos reprodutores	0.8125	0.1681
7ª 20 de junho	Folhas	0.8970	0.1310
	Órgãos reprodutores	0.8585	0.8888

Na comparação das atividades em cada órgão ao longo das diferentes datas de colheita (Quadro 4) observam-se diferenças significativas em todas as modalidades demonstrando que o fator data influencia a atividade da GS e da NR. Deste modo, realizou-se um teste de comparação múltipla de médias, o teste de Tukey, que apresentou valores significativamente superiores na 6ª data nas modalidades testemunha e dose dupla, tanto nas folhas como nos órgãos reprodutores, para a NR. Nas árvores com a aplicação de dose normal de bioestimulante verificaram-se valores superiores de atividade enzimática de NR nas folhas na 2ª e 6ª datas e nos pequenos frutos na 6ª data. Nas restantes datas, nota-se um decréscimo uniforme nas folhas em todas as modalidades praticadas, sendo a ordem decrescente de atividade enzimática: 6ª, 2ª, 4ª, 5ª, 3ª, 1ª e 7ª datas. No que respeita aos órgãos reprodutores, para as modalidades simples e dupla, o efeito do bioestimulante é mais acentuado na 6ª data, como já foi referido, decrescendo por esta ordem 2ª, 4ª, 5ª, 7ª, 1ª e 3ª datas, registando na modalidade testemunha a mesma ordem mas com a permuta da 2ª e 4ª

datas. Esta tendência pode dever-se à influência dos dados climáticos verificados durante o período de ensaio. Na 1ª data, a temperatura não excedeu os 20 °C e o valor de radiação foi baixo, na 3ª e 7ª datas, apesar das temperaturas não terem grande oscilação, registou-se a ocorrência das maiores chuvas que pode ter influenciado a absorção de N, uma vez que o azoto na forma nítrica e na presença de grandes quantidades de água é mais facilmente lixiviado e também haverá ocorrência de menor transpiração, reduzindo a chegada de nitrato à folha por via xilémica.

Relativamente à atividade enzimática da GS e com base nos resultados do teste de Tukey, verifica-se que na 2ª data, as folhas apresentaram valores superiores para todas as modalidades praticadas, sendo que na testemunha além da 2ª data, a 4ª data também apresentou valores semelhantes de atividade da GS.

Nas flores ou pequenos frutos, dependendo da data de colheita, a comparação de médias mostrou que na modalidade testemunha a 6ª e 4ª datas apresentaram valores significativamente superiores de atividade da GS relativamente às restantes datas (2ª, 5ª, 3ª, 7ª e 1ª). A aplicação de dose simples ou dupla manifestou diferenças significativas entre a 2ª e 6ª datas face às restantes (4ª, 5ª, 7ª, 3ª e 1ª). Mais uma vez, a 7ª, 3ª e 1ª datas mostram resultados inferiores na comparação de médias, tal como foi observado na atividade da NR.

Em todas as modalidades a 6ª data de colheita apresentou valores mais elevados de atividade enzimática da NR e GS, que poderemos associar a vários acontecimentos. O estado fenológico verificado a 14 de junho, estado 71 (escala BBCH), exige um redireccionamento de assimilados para os órgãos reprodutores, como já foi referido, que pode explicar a grande atividade enzimática refletida nestes órgãos. No entanto, as folhas também manifestam atividades superiores na 6ª data e 2ª relativamente à NR e na 2ª, 6ª e 4ª datas respeitante à GS e são considerados órgãos *source*. Neste caso, podemos atribuir a influência dos dados climáticos durante o período de ensaio. Entre a 1ª data de colheita e a 2ª, verificou-se uma oscilação acentuada da temperatura, registando-se valores na ordem dos 15-20°C, com máximas a chegar aos 30°C acompanhadas de valores de radiação elevados. Na 6ª data, também se verificaram temperaturas na ordem dos 20 °C acompanhados de elevadas radiações. Na 4ª data as temperaturas apresentam médias abaixo dos 15 °C e radiações muito inferiores às registadas na 2ª ou 6ª data. Outro fator a ter em conta e que pode explicar os elevados valores de GS na 4ª data, nomeadamente na modalidade testemunha, reside no substrato que a Glutamina sintetase utiliza na assimilação de azoto. As enzimas envolvidas neste estudo, NR e GS, participam em mecanismos de assimilação de azoto, usando respetivamente azoto na forma amoniacal e na forma nítrica como substratos para o seu funcionamento. A GS ao usar a forma  $N-NH_4^+$ , esta pode derivar da absorção radicular ou da

parte aérea, nomeadamente através da redução do ião nitrato pela NR. Desta forma, os elevados valores da GS apresentados pelas folhas na 4ª data, bem como os resultados observados no quadro 3 que apresentaram diferenças significativas na 4ª data entre modalidades podem estar relacionados com a origem do ião amónio que a GS utiliza como substrato para formar glutamina. Quer isto dizer que a forma azotada  $\text{N-NH}_4^+$  pode derivar, além da absorção radicular, da fotorrespiração que ocorre nos tecidos verdes (Varennnes, 2003).

**Quadro 4** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o tipo de órgão analisado nas diferentes datas de colheita, para ambas a cultivar Arbequina. ( $\alpha = 0,05$ ) (\*a sombreado salientam-se os p-value inferiores ao nível de significância).

Modalidade	Arbequina	<i>p-value</i>	
		NR	GS
Testemunha	Folhas	0.0000	0.0000
	Órgãos reprodutores	0.0000	0.0000
Simples	Folhas	0.0000	0.0000
	Órgãos reprodutores	0.0000	0.0000
Dupla	Folhas	0.0000	0.0000
	Órgãos reprodutores	0.0000	0.0000

Os resultados obtidos para a Arbequina demonstraram que a ausência de bioestimulante manifestou melhores resultados nas atividades de GS nas folhas e órgãos reprodutores e na atividade de NR apenas nas flores/frutos. Apenas no desempenho da NR nas folhas se notou efeito positivo com melhores desempenho aquando a aplicação de dose dupla de Goëmar.

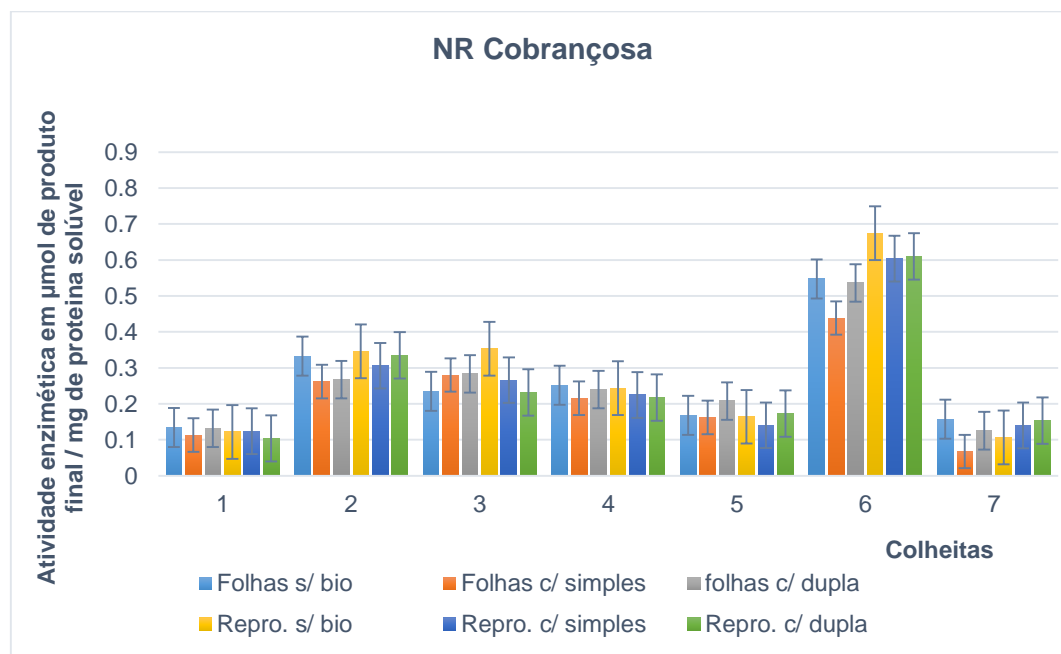
#### 4.2.2. 'Cobrançosa'

A cultivar Cobrançosa apresenta valores de atividade da enzima nitrato redutase com algumas oscilações, apresentando o maior pico de atividade na 6ª data de colheita, tal como na cultivar Arbequina. As amostras foliares, ao longo do período de ensaio, manifestaram valores mais elevados na ausência de bioestimulante, à exceção da 3ª e 5ª datas cuja dose dupla do extrato de algas revelou ser mais benéfica em relação à dose simples e testemunha. No que diz respeito à atividade da NR nos órgãos reprodutores, a modalidade testemunha demonstrou valores mais favoráveis na 2ª, 3ª, 4ª e 6ª datas, a dose dupla apresentou valores



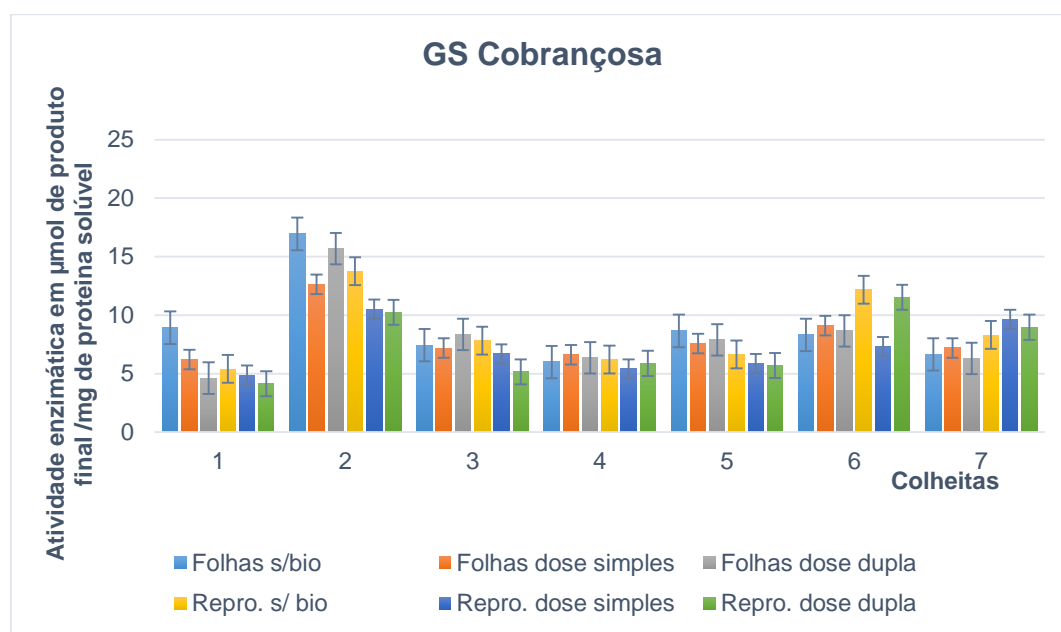
superiores na 5ª e 7ª datas e a dose simples apenas manifestou atividades mais elevadas na 1ª data de colheita (figura 34).

Nesta cultivar, a atividade da NR também registou um pico na 6ª data, tal como na 'Arbequina', no entanto salienta-se o facto da 'Cobrançosa' registar valores elevados tanto nas folhas como nos órgãos reprodutores, ao contrário da 'Arbequina' que apenas registou nos pequenos frutos. Este aumento de atividade mostrou existir diferenças significativas nas folhas entre a modalidade testemunha e dose dupla face à dose simples. Este resultado pode evidenciar uma maior eficiência na atividade fotossintética ao nível das folhas que manifestaram diferenças. Com base nas leituras efetuadas com o SPAD, poder-se-ia eventualmente verificar a eficiência fotossintética, no entanto, na 6ª data não se conseguiram efetuar leituras nas folhas devido à intensidade da cor que impossibilita a medição.



**Figura 34** - Atividade média da enzima NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas é o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante.

A atividade da GS acompanha a tendência oscilatória verificada na cultivar Arbequina, com valores mais elevados na 2ª data de colheita. Ao observar a figura 35, verifica-se que a modalidade dose simples teve o melhor desempenho na atividade da GS da cultivar Cobrançosa, comparando com as atividades enzimáticas já comentadas. Na última data de colheita, a aplicação de dose simples de bioestimulante mostrou ser mais benéfica tanto para as folhas como para os pequenos frutos vingados. Na 4ª e 6ª datas, a dose simples apenas influenciou positivamente a atividade nas folhas. Nos órgãos reprodutores a aplicação de bioestimulante mostrou ser desnecessária, pois os valores mais elevados de atividade da GS verificaram-se na modalidade testemunha, à exceção da 7ª data, como já foi referido.



**Figura 35** - Atividade média da enzima GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  de proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de folhas e órgãos reprodutores. O comprimento das linhas corresponde ao erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folhas s/ bio – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Folhas dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; folhas dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante; Repro. s/bio – órgãos reprodutores de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Repro. dose simples - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Repro. dose dupla - órgãos reprodutores de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante.

Mediante a análise do resultado estatístico que compara as três modalidades estudadas ao longo das datas de colheita, pode-se verificar a existência de diferenças significativas (quadro 5) quando o valor de *p-value* é inferior a 0,05. A atividade de NR apenas revelou diferenças entre o tipo de tratamento realizado, nos valores referentes às folhas na 6ª

data (*p-value* de 0.0122), tendo a dose dupla e testemunha uma diferença significativa da dose simples. Relativamente aos valores da GS resultante da análise de variância, ANOVA, a 1ª e 3ª datas apresentaram valores de *p-value* inferiores ao nível de significância de 0,05 (0.0384 e 0.0124 respetivamente) sugerindo na 1ª data uma diferença significativa nos resultados obtidos na modalidade testemunha face às restantes, para as amostras de folhas. Na 3ª data verificou-se o mesmo, mas para os órgãos reprodutivos.

**Quadro 5** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o efeito de cada modalidade em cada data de colheita para a cultivar Cobrançosa. ( $\alpha = 0,05$ ) (\*a sombreado salientam-se os *p-value* inferiores ao nível de significância).

Colheitas	Cobrançosa	<i>p-value</i>	
		NR	GS
1ª 09 de maio	Folhas	0.4216	0.0384
	Órgãos reprodutivos	0.3002	0.3228
2ª 16 de maio	Folhas	0.1915	0.1524
	Órgãos reprodutivos	0.8245	0.0586
3ª 23 de maio	Folhas	0.1757	0.5186
	Órgãos reprodutivos	0.0847	0.0124
4ª 30 de maio	Folhas	0.4292	0.4814
	Órgãos reprodutivos	0.6521	0.1443
5ª 06 de junho	Folhas	0.5535	0.1658
	Órgãos reprodutivos	0.3482	0.5506
6ª 14 de junho	Folhas	0.0122	0.3021
	Órgãos reprodutivos	0.5893	0.1675
7ª 20 de junho	Folhas	0.2673	0.4125
	Órgãos reprodutivos	0.3976	0.2334

As atividades enzimáticas variam significativamente ao longo das datas (quadro 6) tanto nas folhas como nos órgãos reprodutivos.

O teste de comparação de médias revelou para a GS resultados mais favoráveis na 2ª data, em todas as modalidades praticadas, no que respeita aos órgãos foliares. Relativamente ao comportamento dos órgãos reprodutivos ao longo do período de ensaio, observaram-se diferenças significativas na 2ª data nas modalidades testemunha e dose simples, com a 6ª e 7ª datas a apresentarem valores intermédios imediatamente a seguir à 2ª data. Na modalidade

em que se aplicou a dose dupla de bioestimulante, a 6<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> datas apresentaram diferenças significativas em relação às restantes datas de colheita.

Relativamente à atividade da NR, existem diferenças significativas entre as datas de colheita para as três modalidades estudadas. Analisando os resultados do teste de Tukey, verifica-se que tanto nas folhas como nos órgãos reprodutores a 6<sup>a</sup> data de recolha de amostras manifestou diferenças significativas em relação às restantes datas de colheita, em todas as modalidades do ensaio.

**Quadro 6** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre o tipo de órgão analisado nas diferentes datas de colheita, para a cultivar Cobrançosa. ( $\alpha = 0,05$ ) (\*a sombreado salientam-se os p-value superiores ao nível de significância).

Modalidade	Cobrançosa	<i>p-value</i>	
		NR	GS
Testemunha	Folhas	0.0000	0.0000
	Órgãos reprodutores	0.0000	0.0011
Simples	Folhas	0.0000	0.0000
	Órgãos reprodutores	0.0000	0.0000
Dupla	Folhas	0.0000	0.0000
	Órgãos reprodutores	0.0000	0.0000

Os resultados obtidos para a Cobrançosa demonstraram que a ausência de bioestimulante manifestou melhores resultados nas atividades de GS e NR, no geral. No entanto a aplicação de dose simples de Goëmar mostrou alguma relevância na atividade da NR ao nível das folhas e a dose dupla na NR dos órgãos reprodutores.

Na generalidade dos resultados as atividades enzimáticas de ambas as enzimas das duas cultivares em estudo apresentaram oscilações semelhantes, sendo os valores da 'Cobrançosa' um pouco inferiores aos registados pela 'Arbequina'. Esta diferença pode dever-se à densidade da copa, que é bastante superior na 'Arbequina', levando a que esta tenha uma atividade metabólica superior e assim valores de atividades enzimáticas também superiores.

Estudos prévios em que também foi estudada a influência de aplicação do mesmo produto biestimulante, nomeadamente na cultivar Cobrançosa, realizados por João Soares Lopes em 2011 e Rodrigo Capela em 2013 mostraram existir uma correlação positiva entre as amostras tratadas e o efeito nas enzimas NR e GS.

Lopes, em 2011, verificou que na 'Cobrançosa', existiram diferenças significativas na atividade enzimática da NR e GS nos órgãos reprodutivos, com a aplicação de bioestimulante durante a fase primordial do desenvolvimento do fruto, correspondendo aos estados fenológicos 68 a 71. Também Capela, em 2013, verificou o mesmo efeito positivo, não só nos órgãos reprodutores como nas folhas também. No presente estudo, o efeito do bioestimulante não mostrou resultados tão claros, uma vez que a existência de diferenças significativas nas atividades enzimáticas ocorreram nas folhas durante o estado fenológico 71 e nos órgãos reprodutores antes da plena floração (estado 60) e à queda das flores (estado 68), antes do vingamento do fruto.

Neste estudo verificámos, em ambas as cultivares, que a atividade da NR nas folhas e órgãos reprodutores aumentou durante a plena floração, mantendo valores de atividade maiores até à fase do vingamento e crescimento do fruto, tendo diminuindo substancialmente na fase seguinte de crescimento do fruto (endurecimento do endocarpo). O mesmo foi verificado por Lopes (2011), para a cultivar Cobrançosa e por Capela (2013) para as cultivares Galega e Cobrançosa.

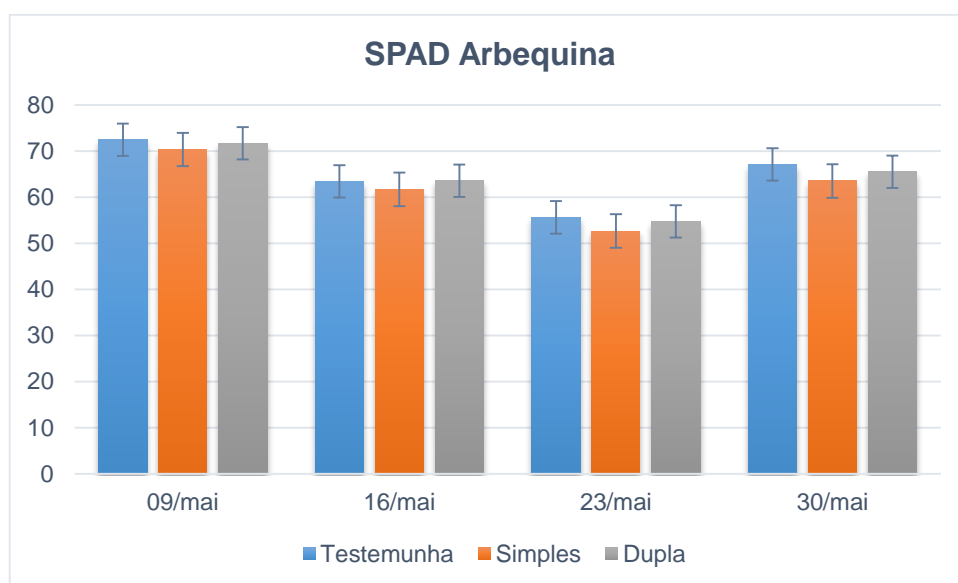
#### **4.3. SPAD**

O ensaio de medição do teor de clorofila presente nas folhas da cultivar Arbequina e Cobrançosa decorreu no mês de maio, a par das primeiras 4 datas de colheita do ensaio enzimático. Não se prolongou nas restantes datas devido ao surgimento de dificuldades nas medições com o aparelho SPAD pois este só fornecia valores no caso de folhas menos espessas, ou seja, mais jovens. Desta forma, em vez de se tratar de uma amostra aleatória, trata-se de uma monitorização de dados, nas folhas possíveis, não dando uma situação normal, mas sim a alcançável.

O tratamento dos dados resultantes dos valores lidos no aparelho SPAD envolveu uma comparação estatística, através de uma análise de variância, ANOVA. Realizou-se uma comparação entre as medições obtidas no lado esquerdo e direito da folha. Não se observaram diferenças significativas em ambas as cultivares pelo que se optou por utilizar, para cada folha, a média dos dois lados. Seguidamente analisou-se a existência de diferenças entre as 3 árvores, dentro da mesma modalidade, cujo resultado também não mostrou existir

diferenças significativas para um nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Por conseguinte, para cada modalidade, utilizou-se uma amostra de 30 medições (obtidas em 3 árvores com 10 medições por árvore) com os valores médios de SPAD.

Os valores observados na cultivar Arbequina mostraram uma tendência decrescente ao longo das 3 primeiras datas com um ligeiro aumento na 4ª data, sendo as modalidades testemunha e dose dupla as que apresentaram valores mais elevados (figura 36).



**Figura 36** - Medições do teor de clorofila através do SPAD na cultivar Arbequina. O comprimento das linhas corresponde ao erro padrão ( $n=30$ ). Legenda: Testemunha – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante.

Ao comparar os valores de SPAD das três modalidades estudadas em cada data do ensaio para a cultivar Arbequina, não se observaram diferenças significativas (quadro 7). O mesmo não se verifica quando se comparou a influência da data de medição para cada modalidade (quadro 8).

**Quadro 7** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre modalidades ao longo das datas de medição, para a cultivar Arbequina ( $\alpha = 0,05$ ).

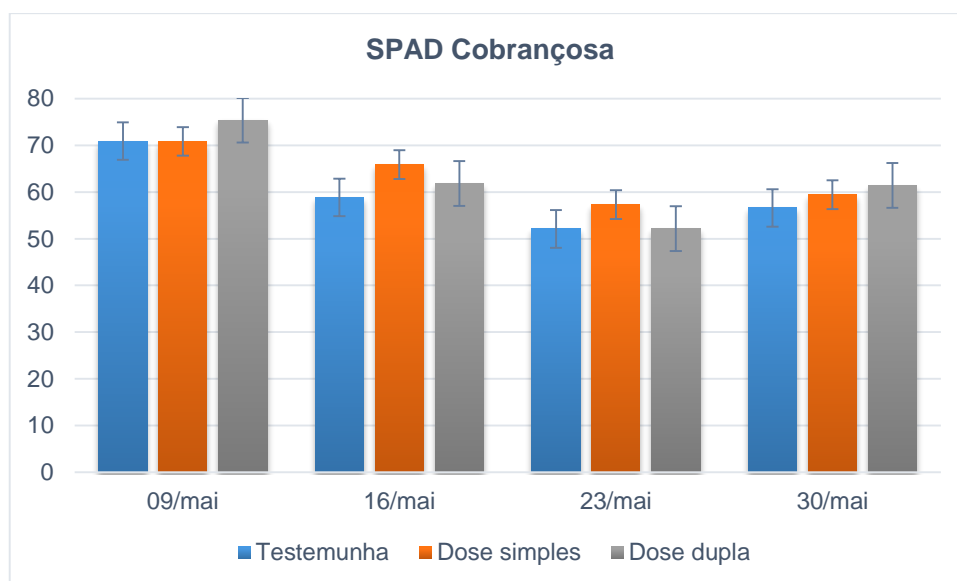
Medições	SPAD ( <i>p-value</i> )
1ª 09 de maio	0.6518
2ª 16 de maio	0.8481
3ª 23 de maio	0.5900
4ª 30 de maio	0.4673

Mediante os valores de *p-value* verificados no quadro 8 que mostram existir diferenças significativas ao longo das datas de medição para as modalidades em estudo, realizou-se um teste de comparação múltipla de médias, o teste de Tukey. As medições realizadas no dia 9 de maio registaram valores superiores em todas as modalidades. Nas árvores sem bioestimulante a 1ª data foi significativamente diferente da 3ª data, tendo a 4ª e 2ª data apresentado valores intermédios. Nas árvores em que se efetuou a aplicação de dose simples e dupla verificaram-se diferenças significativas entre a 1ª, 2ª e 3ª datas, tendo a 4ª data apresentado valores intermédios entre a 1ª e 2ª datas.

**Quadro 8** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre as datas de medição para as três modalidades estudadas, para a cultivar Arbequina ( $\alpha = 0,05$ ). (\*a sombreado salientam-se os *p-value* inferiores ao nível de significância).

Modalidades	SPAD ( <i>p-value</i> )
Testemunha	0.0000
Dose simples	0.0000
Dose dupla	0.0000

As medições do teor de clorofila na cultivar Cibranchosa mostraram uma oscilação semelhante à verificada na cultivar Arbequina. As árvores submetidas à aplicação de bioestimulante com dose dupla manifestaram valores de SPAD superiores na 1ª e 4ª datas enquanto a dose simples apresentou valores mais elevados nas datas intermédias (figura 37).



**Figura 37** - Medições do teor de clorofila através do SPAD na cultivar Cobrançosa. O comprimento das linhas corresponde ao erro padrão (n= 30). Legenda: Testemunha – folhas de oliveira sem a aplicação de bioestimulante; Dose simples – folhas de oliveira com aplicação de dose simples de bioestimulante; Dose dupla – folhas de oliveira com aplicação de dose dupla de bioestimulante.

Entre as modalidades estudadas, verificaram-se valores de *p-value* inferiores a 0,05 na 2ª e 3ª datas (0,0193 e 0,0028 respectivamente). Na 2ª data, o tratamento com dose simples apresentou valores superiores e significativamente diferentes da modalidade testemunha. Na 3ª data, a modalidade dose simples diferiu significativamente das restantes (quadro 9).

**Quadro 9** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre modalidades ao longo das datas de medição, para a cultivar Cobrançosa ( $\alpha= 0,05$ ). (\*a sombreado salientam-se os *p-value* inferiores ao nível de significância).

Medições	SPAD ( <i>p-value</i> )
1ª 09 de maio	0.2085
2ª 16 de maio	0.0193
3ª 23 de maio	0.0028
4ª 30 de maio	0.0797

Analisando para cada data o efeito da aplicação do bioestimulante, verifica-se estatisticamente a existência de diferenças (quadro 10), que com base no teste de Tukey, se notam valores superiores do teor de clorofila na 1ª data seguindo a 2ª, 4ª e 3ª datas com



valores decrescentes. Esta tendência poderá estar relacionada com o crescimento das folhas e momentânea diluição aparente dos conteúdos celulares. A aplicação de dose dupla de Goëmar e a modalidade testemunha mostraram existir diferenças significativas entre a 1ª datas e as restantes, apresentando a 1ª data valores superiores; já a aplicação do extrato de algas em dose simples manifestou valores próximos de SPAD entre a 1ª e 2ª datas que foram significativamente superiores aos das restantes datas. Este aspeto poderá relacionar-se com a elevada temperatura observada na 3ª data.

**Quadro 10** - Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre as datas de medição para as três modalidades estudadas, para a cultivar Cobrançosa ( $\alpha = 0,05$ ). (\*a sombreado salientam-se os *p-value* inferiores ao nível de significância).

Modalidades	SPAD ( <i>p-value</i> )
Testemunha	0.0000
Dose simples	0.0000
Dose dupla	0.0000

Relativamente aos resultados na cultivar Arbequina, estes não sugerem nenhum efeito do bioestimulante sobre os valores lidos pelo SPAD referentes ao teor de clorofila. Não foram encontradas diferenças lógicas que se possam atribuir à aplicação do bioestimulante. A cultivar Cobrançosa refletiu a influência da aplicação do extrato de algas uma vez que a dose simples mostrou diferenças significativas em relação às restantes modalidades ensaiadas.

Os resultados verificados na Cobrançosa refletiram o efeito esperado da aplicação de Goëmar, uma vez que este contém betainas que retardam a degradação de clorofila, levando a níveis mais elevados dos teores de clorofila nas folhas.

A realização do ensaio de leitura do teor de clorofila nas folhas teve o objetivo de verificar a correlação dos valores obtidos pelo SPAD e os resultados das atividades enzimáticas da NR e GS. Em ambas as cultivares, as oscilações observadas nos valores de SPAD não acompanham a evolução das atividades enzimáticas verificadas nas folhas. A falta de relação entre a leitura do SPAD e o teor de N nas folhas indicam que boa parte do N absorvido ao longo da evolução fenológica pode ser utilizado para a produção de outras estruturas da planta e não para a formação de clorofila. De um modo geral, a absorção de  $\text{NO}_3^-$  é favorecida pelo maior estado energético das plantas e aumenta durante o período diurno quando se dá a fotossíntese, desta forma, seria de esperar uma evolução nos teores de clorofila semelhante à da atividade da NR, o que não se verifica. Por exemplo, um dos maiores picos de atividade enzimática da NR nas folhas de ambas as cultivares em estudo

dá-se na 2ª data que corresponde a um decréscimo nas medições do teor de clorofila na mesma data nas duas cultivares.

Um estudo realizado em 2014 pela colega Marta Soveral, que utilizou o aparelho SPAD na medição do teor relativo de clorofila nas folhas de oliveira da cultivar Tosca, mostrou existir uma correlação positiva entre os valores obtidos e a aplicação do bioestimulante Goëmar. O mesmo se verificou neste estudo para a cultivar Cobrançosa que evidenciou teores superiores de clorofila em amostras com aplicação de bioestimulante efetuada em dose simples. No entanto, Soveral (2014) teve dificuldades nas medições de campo, devido ao fato das folhas de oliveira serem demasiado escuras e devido à elevada intensidade luminosa que se verificou no lado oeste das árvores utilizadas no seu estudo, que levou a uma seleção negativa das folhas, dadas as leituras só se terem conseguido efetuar em folhas mais claras e menos expostas à luz. A mesma dificuldade foi verificada neste estudo, durante as visitas de campo, tendo-se antecipado o fim das medições pela inviabilidade dos resultados que se iriam obter ao efetuar-se uma seleção das folhas.

## 5. Conclusões

As cultivares Arbequina e Cobrançosa mostraram tendências semelhantes na evolução das atividades enzimáticas da NR e GS ao longo do tempo, nos órgãos foliares e reprodutores, apresentando dois picos de atividade na 2ª e 6ª datas. A explicação mais coerente para o cenário observado prende-se com a evolução da fenologia da oliveira. A 2ª data correspondeu à época de plena floração (estado 65 da escala BBCH) e a 6ª data ao engrossamento do fruto e formação do endocarpo (estado 71 da escala BBCH). Durante estes estádios de desenvolvimento, provavelmente existe uma maior translocação de nutrientes, nomeadamente de azoto, o que leva à migração de assimilados das zonas *source*, neste caso, as folhas, até às zonas *sink*, órgãos reprodutores.

Na cultivar Arbequina, e a partir dos resultados obtidos ao longo das datas de colheita, verificou-se apenas na 4ª data a existência de diferenças significativas entre as modalidades em estudo, relativas à atividade enzimática da GS nas folhas e órgãos reprodutores. As árvores não tratadas com o bioestimulante apresentaram valores significativamente superiores nos órgãos reprodutores em relação às árvores tratadas. Nas folhas, a modalidade testemunha foi significativamente superior à dose dupla que, por sua vez, foi superior à dose simples. Estes resultados evidenciam que a aplicação do bioestimulante produzido à base de um extrato de algas não promoveu e pode até ter limitado o desempenho da GS nas folhas e órgãos reprodutores, ou seja, pode ter restringido a utilização de formas de azoto amoniacal disponíveis.

A cultivar Cobrançosa apresentou diferenças significativas em ambas as atividades enzimáticas ao longo do tempo. Na 1ª e 3ª datas, a modalidade testemunha manifestou atividades de GS significativamente superiores às árvores tratadas com o bioestimulante, nas folhas e órgãos reprodutores, respetivamente. Na 6ª data a atividade da NR nas folhas foi significativamente superior nas modalidades testemunha e dose dupla. Estes resultados demonstram que a aplicação do bioestimulante não contribuiu de forma significativa para o aumento das atividades enzimáticas da NR e GS nas folhas e órgãos reprodutores.

As leituras efetuadas com o SPAD nas folhas de ambas as cultivares não apontaram para nenhum padrão de comportamento, pois não acompanharam a tendência verificada nas atividades enzimáticas, devido provavelmente à dificuldade nas leituras do teor de clorofila das folhas de oliveira. Ainda assim, na cultivar Cobrançosa observou-se teores mais elevados de clorofila nas árvores tratadas com dose simples de Goëmar que pode resultar do efeito das betaínas presentes na composição do bioestimulante, que retardam a senescência das folhas, retardando a degradação do conteúdo de clorofila. As oscilações dos valores do SPAD podem

estar relacionadas com as variações térmicas, que condicionam a atividade metabólica nas plantas.

Salienta-se que a aferição do efeito da aplicação de Goëmar neste estudo contemplou a quantificação enzimática da NR e GS e a medição indireta do teor de clorofila através do SPAD. Poder-se-ia chegar a um resultado mais objetivo comparando os resultados obtidos com valores de análise foliares e produções finais, no entanto no ano de 2013 não foi possível realizar determinadas operações periódicas devido a alterações logísticas na gestão do olival.

O efeito da aplicação do extrato de algas da Goëmar em oliveiras tem sido alvo de vários estudos nos últimos anos e na generalidade dos casos não se nota uma tendência clara de aumento das atividades enzimáticas das principais enzimas do ciclo do azoto, NR e GS. Sendo a oliveira uma árvore robusta, grande adaptabilidade a diferentes microclimas e elevado poder tampão, a sua resposta poderá não ser tão evidente quanto a de outras espécies mais delicadas, como a vinha ou hortícolas, sendo interessante em estudos futuros em vinha estudar a influência em uva de mesa e uva para vinho.

## 6. Bibliografia

- Allen, R., Pereira, L., Raes, D., & Smith, M. (1998). *FAO Irrigation and Drainage paper no. 56*. Rome: FAO.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., & Rallo, L. (1999). *El Cultivo del Olivo*. Universidade de Córdoba: Ediciones Mundi-Prensa.
- Blaya, S., & Garcia, G. (2000). El Nitrogeno en la Planta. Em S. Blaya, & G. Garcia, *Química Agrícola* (pp. 165- 182). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Bradford, M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.
- Bredemeier, C., & Mundstock, C. (2000). Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural*, 30, pp. 365-372.
- Capela, R. (2013). *Efeito de um extrato de algas nas atividades da nitrato redutase e da glutamina sintase em Oliveira (Olea Europaea L.) 'Galega vulgar' e 'Cobrançosa'*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.
- Casa do Azeite. (13 de dezembro de 2013). <http://www.casadoazeite.pt/DADOSSECTOR/tabid/56/Default.aspx>. Obtido de <http://www.casadoazeite.pt>.
- Cordeiro, A., Calado, M., Morais, N., Miranda, A., & Carvalho, M. (Fevereiro de 2010). Cobrançosa. *Vida Rural*, p. 19.
- Dragicevic, M., Todorovic, S., Bogdanovic, M., Filipovic, B., Misic, D., & Simonovic, A. (2014). Knockout mutants as a tool to identify the subunit composition of Arabidopsis glutamine synthetase isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 79, pp. 1-9.
- Erel, R., Kerem, Z., Ben-Gal, A., Dag, A., Schwartz, A., Zipori, I., Yermiyahu, U. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) Tree Nitrogen Status Is a Key Factor for Olive Oil Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, pp. 11261-11272.
- European Biostimulants Industry Council. (25 de setembro de 2014). *Benefits of Biostimulants*. Obtido de European Biostimulants Industry Council: <http://www.biostimulants.eu/benefits-of-biostimulants/sustainable-agriculture/>
- FAO (26 de Novembro de 2013). Obtido de FAOSTAT: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>

- Fernandez-Escobar, R. O.-U. (2008). Nitrogen status influence on olive tree flower quality and ovule longevity. *Environmental and Experimental Botany*, 64, pp. 113-119.
- García, A. G. (2005). *Cultivo Moderno do Olival*. Publicações Europa-América.
- Goemar, Le Laboratoire de la Mer. (s.d.). *Brochura do produto*.
- Guerrero, A. (1997). *Nueva Olivicultura*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Imsande, J., & Touraine, B. (1994). N demand and regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology*, pp. 3-7.
- INE. (2013). *Estatísticas Agrícolas 2012*. Instituto Nacional de Estatística.
- Internacional Olive Council. (2008). *Olive Nursery Production and Plant Production Techniques*. Copyright.
- IPMA. (10 de 2015). *Clima: normas climatológicas*. Obtido de Instituto português do mar e da atmosfera: [www.ipma.pt](http://www.ipma.pt)
- Jesus, S., & Marenco, R. (2008). O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta Amazónica*.
- Jorge, M. (10 de Outubro de 2012). Continua a valer a pena investir em Olival em Portugal ? *Conferências Vida Rural*.
- Kaiser, J., & Lewis, O. (1984). Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil*, 70, pp. 127-130.
- Lavee, S. (1996). Biologia e Fisiologia da Oliveira. Em C. O. Internacional, *Enciclopédia Mundial da Oliveira* (pp. 61-110). Espanha: Plaza & Janés Editores, S.A.
- Leitão, P. P. (1986). *Descrição de 22 variedades de Oliveira cultivadas em Portugal*. Lisboa: DGPA.
- Lopes, J. (2011). *Polonização em oliveira cvs. Galega e Cobrançosa: avaliação do vingamento em ensaios de polinização controlada e do efeito da aplicação de um bioestimulante*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.
- Lopez-Villalta, L. (1996). Técnicas de produção. Em C. O. Internacional, *Enciclopedia mundial del olivo* (pp. 145-190). Madrid: Conselho Oleícola Internacional.
- López-Villalta, L. (1996). Técnicas de produção. Em C. o. internacional, *Enciclopédia Mundial da Oliveira* (pp. 145-190). Madrid: Plaza & Janés Editores, S.A.

- Loussert, R., & Brousse, G. (1980). *El Olivo*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- MADRP. (2007). Olivicultura.
- Malavolta, E., Vitti, G., & Oliveira, S. (1997). *Avaliação do estado nutricional das plantas*. Piracicaba: Potafos.
- Maldonado, J., Agüera, E., & Vicente, R. (2000). Asimilación del nitrógeno y del azufre. Em J. Azcón-Bieto, & M. Talón, *Fundamentos de fisiología vegetal* (pp. 235-246). Barcelona: Ediciones Universitat de Barcelona.
- Marcelo, M. (2001). *Influência da adubação azotada, potássica e magnésiana em aspectos quantitativos e qualitativos da produção da oliveira (cvs. Carrasquenha e Picual)*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.
- Marti, J., & Aroca, A. (1993). *Variedades del Olivo*. Barcelona: Editorial Aedos, S.A.
- Mendel, R. (2007). Biology of the molybdenum cofactor. *Journal of Experimental Botany*, 58 (9), pp. 2289-2296.
- Mengel, K., & Kirkby, E. (2001). *Principles of plant nutrition*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Mengel, K., & Kirkby, E. A. (1978). Nutrition Uptake and Assimilation. Em K. Mengel, & E. A. Kirby, *Principles of Plant Nutrition* (pp. 97-162). Switzerland: International Potash Institute.
- Miller, A. J., Fan, X., Shen, Q., & Smith, S. (Dez de 2007). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*, 59, pp. 111-119.
- Miller, A., & Cramer, M. (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and soil*, 274, pp. 1-36.
- Nasir, S., Malik, & Perez, J. (10 de Junho de 2011). The effect of high temperature interruptions during inductive period on the extent of flowering and on metabolic responses in olives (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 129, pp. 207-212.
- Neto, C. (2007). *Estudo da dinâmica do azoto em pereira (Pyrus communis L.)*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.

- Nicodemus, M. A., Salifu, F., & Jacobs, D. (2008). Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. *Trees*, 22, pp. 685-695.
- Olive oil flavors. (9 de Setembro de 2015). *Olive Oil tree - Arbequina*. Obtido de [www.oliveoilflavors.com](https://oliveoilflavors.com/en/content/25-olive-tree-arbequina): <https://oliveoilflavors.com/en/content/25-olive-tree-arbequina>
- Pansiot, F., & Rebour, H. (1970). *Mejoramiento del Cultivo del Olivo*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- R7 Educação. (29 de 01 de 2015). *Alunos Online*. Obtido de <http://www.alunosonline.com.br/>: <http://www.alunosonline.com.br/biologia/os-cloroplastos.html>
- Sanz-Cortés, F., Martínez-Calvo, J., Badenes, M., Bleiholder, H., Hack, H., Llacer, G., & Meier, U. (2002). Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea* L.). *Annals Applied Biology*, 140, pp. 151-157.
- Simek, M., & Cooper, J. (2001). Nitrogen use efficiency in temperate zone arable lands . Em M. Shiyomi, & H. Koizumi, *Structure and function in agroecosystem design and management* (pp. 227-251). Boca Raton: CRC Press.
- Soveral, M. (2014). *Fatores que afetam o vingamento em oliveira (Olea europaea L.) cv. Tosca: efeito da polinização cruzada e da aplicação de um extrato de algas*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.
- Spectrum Technologies, Inc. (2009). *SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter, Product Manual*. USA: Spectrum Technologies, Inc. .
- Taiz, L., & Zeiger, E. (1991). Assimilation of Mineral Nutrients. Em L. Taiz, & E. Zeiger, *Plant Physiology* (pp. 292-317). The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Teixeira, A., & Ricardo, C. (1983). *Fotossíntese*. Lisboa: Didactica Editora.
- Varennas, A. (2003). *Produtividade dos solos e ambiente*. Lisboa: Escolar Editora.
- Zotarelli, L. e. (2003). Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, pp. 1117-1122.



## **7. Anexos**

### **Anexo 1**

(Resultados das análises estatísticas do ensaio de quantificação enzimática das cv.  
Arbequina e Cobrançosa)

Statistix 9.0  
Completely Randomized AOV for  
NR\_FOLHAS

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	3.482E-04	1.741E-04
	2.32	<u>0.1795</u>	
Error	6	4.507E-04	7.511E-05
Total	8	7.989E-04	
Grand Mean	0.1189	CV 7.29	

**Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test		2.86
	0.1343	
O'Brien's Test		1.27
	0.3467	
Brown and Forsythe Test		1.31
	0.3367	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	3.64	0.1697
Error		2.7	

Component of variance for between groups 3.300E-05  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.1277
Simples	0.1140
Testemunha	0.1150

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 5.004E-03  
Std Error (Diff of 2 Means) 7.076E-03

NR\_1ªdata\_Arb,  
Completely Randomized AOV for  
NR\_ORG\_RE

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	7.222E-05	3.611E-05
	0.28	<u>0.7675</u>	
Error	6	7.833E-04	1.306E-04
Total	8	8.556E-04	
Grand Mean	0.1368	CV 8.35	

**Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test		1.55
	0.2870	
O'Brien's Test		0.69
	0.5383	
Brown and Forsythe Test		0.46
	0.6495	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.16	0.8550
Error		3.4	

Component of variance for between groups -3.148E-05  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.1407
Simples	0.1340
Testemunha	0.1357

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 6.597E-03  
Std Error (Diff of 2 Means) 9.329E-03

Statistix 9.0  
Completely Randomized AOV for  
NR\_FOLHAS

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00862	0.00431
	1.33	<u>0.3317</u>	
Error	6	0.01938	0.00323
Total	8	0.02800	
Grand Mean	0.3293	CV 17.26	

**Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test		2.77
	0.1408	
O'Brien's Test		1.23
	0.3569	
Brown and Forsythe Test		0.30
	0.7493	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.63	0.3116
Error		3.7	

Component of variance for between groups 3.596E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.2887
Simples	0.3637
Testemunha	0.3357

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0328  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0464

NR\_2ªdata\_Arb,  
Completely Randomized AOV for  
NR\_ORG\_RE

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00057	0.00028
	0.11	<u>0.8955</u>	
Error	6	0.01512	0.00252
Total	8	0.01569	
Grand Mean	0.2892	CV 17.36	

**Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test		1.65
	0.2685	
O'Brien's Test		0.73
	0.5188	
Brown and Forsythe Test		0.17
	0.8443	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.14	0.8744
Error		3.8	

Component of variance for between groups -7.458E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.2780
Simples	0.2947
Testemunha	0.2950

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0290  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0410

Statistix 9.0  
Completely Randomized AOV for  
NR\_FOLHAS

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	1.488E-05	7.444E-06
	0.06	<u>0.9380</u>	
Error	6	6.900E-04	1.150E-04
Total	8	7.049E-04	
Grand Mean	0.1621	CV 6.62	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
		<b>P</b>	
Levene's Test			2.16
	0.1961		
O'Brien's Test			0.96
	0.4343		
Brown and Forsythe Test			0.27
	0.7752		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.11	0.8970
Error		3.7	
Component of variance for between groups -3.585E-05			
Effective cell size			
3.0			
<b>MODALIDAD</b>		<b>Mean</b>	
Dupla		0.1627	
Simples		0.1633	
Testemunha		0.1603	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		6.191E-03	
Std Error (Diff of 2 Means)		8.756E-03	

Statistix 9.0  
Completely Randomized AOV for  
NR\_FOLHAS

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00118	5.908E-04
	1.14	<u>0.3797</u>	
Error	6	0.00310	5.169E-04
Total	8	0.00428	
Grand Mean	0.2429	CV 9.36	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
		<b>P</b>	
Levene's Test			1.67
	0.2652		
O'Brien's Test			0.74
	0.5153		
Brown and Forsythe Test			0.55
	0.6028		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.06	0.4470
Error		3.1	
Component of variance for between groups 2.463E-05			
Effective cell size			
3.0			
<b>MODALIDAD</b>		<b>Mean</b>	
Dupla		0.2590	
Simples		0.2333	
Testemunha		0.2363	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		0.0131	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0186	

NR\_3ªdata\_Arb,  
Completely Randomized AOV for  
NR\_ORG\_RE

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00024	1.213E-04
	0.65	<u>0.5551</u>	
Error	6	0.00112	1.866E-04
Total	8	0.00136	
Grand Mean	0.1307	CV 10.45	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
		<b>P</b>	
Levene's Test			1.49
	0.2986		
O'Brien's Test			0.66
	0.5500		
Brown and Forsythe Test			0.62
	0.5687		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.91	0.4855
Error		3.3	
Component of variance for between groups -2.174E-05			
Effective cell size			
3.0			
<b>MODALIDAD</b>		<b>Mean</b>	
Dupla		0.1347	
Simples		0.1340	
Testemunha		0.1233	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		7.886E-03	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0112	

NR\_4ªdata\_Arb,  
Completely Randomized AOV for  
NR\_ORG\_RE

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.09833	0.04916
	4.32	<u>0.0690</u>	
Error	6	0.06835	0.01139
Total	8	0.16668	
Grand Mean	0.3029	CV 35.24	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
		<b>P</b>	
Levene's Test			3.81
	0.0855		
O'Brien's Test			1.69
	0.2612		
Brown and Forsythe Test			1.34
	0.3306		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.91	0.2722
Error		3.6	
Component of variance for between groups 0.01259			
Effective cell size			
3.0			
<b>MODALIDAD</b>		<b>Mean</b>	
Dupla		0.2320	
Simples		0.2260	
Testemunha		0.4507	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		0.0616	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0871	

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00201	0.00100
	1.24	0.3532	
Error	6	0.00484	0.00081
Total	8	0.00685	
Grand Mean	0.2178	CV 13.05	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.35
	0.1760
O'Brien's Test	1.05
	0.4077
Brown and Forsythe Test	0.69
	0.5393

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	2.03	0.2857
Error		2.8	

Component of variance for between groups 6.563E-05  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.2377
Simples	0.2140
Testemunha	0.2017

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0164  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0232

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00231	0.00116
	2.79	0.1392	
Error	6	0.00249	0.00041
Total	8	0.00480	
Grand Mean	0.4008	CV 5.08	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	1.15
	0.3791
O'Brien's Test	0.51
	0.6249
Brown and Forsythe Test	0.13
	0.8816

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.84	0.2774
Error		3.7	

Component of variance for between groups 2.470E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.3800
Simples	0.4190
Testemunha	0.4033

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0118  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0166

NR\_5ªdata\_Arb,  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00863	0.00432
	2.23	0.1883	
Error	6	0.01159	0.00193
Total	8	0.02023	
Grand Mean	0.2231	CV 19.70	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.34
	0.1060
O'Brien's Test	1.48
	0.2994
Brown and Forsythe Test	0.77
	0.5052

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	8.51	0.0519
Error		3.2	

Component of variance for between groups 7.950E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.1897
Simples	0.2153
Testemunha	0.2643

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0254  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0359

NR\_6ªdata\_Arb,  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.01088	0.00544
	0.21	0.8125	
Error	6	0.15185	0.02531
Total	8	0.16273	
Grand Mean	0.8169	CV 19.47	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	0.82
	0.4842
O'Brien's Test	0.36
	0.7089
Brown and Forsythe Test	0.18
	0.8433

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.14	0.8711
Error		3.9	

Component of variance for between groups -0.00662  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.7687
Simples	0.8327
Testemunha	0.8493

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0918  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1299

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00099	0.00050
	0.11	0.8970	
Error	6	0.02691	0.00448
Total	8	0.02790	
Grand Mean	0.1233	CV 54.30	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.60
	0.0940
O'Brien's Test	1.60
	0.2776
Brown and Forsythe Test	2.26
	0.1857

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.66	0.5800
Error		2.8	

Component of variance for between groups -0.00133  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.1367
Simples	0.1110
Testemunha	0.1223

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0387  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0547

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	0.21463	0.03577
	17.60	0.0000	
Error	14	0.02846	0.00203
Total	20	0.24310	
Grand Mean	0.2250	CV 20.04	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.77
	0.0191
O'Brien's Test	1.68
	0.1993
Brown and Forsythe Test	2.47
	0.0766

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	258.14	0.0000
Error		5.5	

Component of variance for between groups 0.01125  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1150
2	0.3357
3	0.1603
4	0.2363
5	0.2017

NR\_7ªdata\_Arb,  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00030	1.523E-04
	0.16	0.8585	
Error	6	0.00584	9.736E-04
Total	8	0.00615	
Grand Mean	0.1823	CV 17.11	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	0.16
	0.8565
O'Brien's Test	0.07
	0.9326
Brown and Forsythe Test	0.01
	0.9930

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.12	0.8889
Error		4.0	

Component of variance for between groups -2.737E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.1880
Simples	0.1847
Testemunha	0.1743

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0180  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0255

NR\_Testemunha\_Arb,  
6 0.4033  
7 0.1223

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0260  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0368

**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	1.18341	0.19724
	22.17	0.0000	
Error	14	0.12453	0.00890
Total	20	1.30795	
Grand Mean	0.3275	CV 28.80	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.07
	0.0393
O'Brien's Test	1.36
	0.2947
Brown and Forsythe Test	1.04
	0.4418

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	19.46	0.0012
Error		5.9	

Component of variance for between groups 0.06278  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
----------	------

1	0.1357
2	0.2950
3	0.1233
4	0.4507
5	0.2643

6	0.8493
7	0.1743

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0545  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0770

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.4033	A
2	0.3357	AB
4	0.2363	BC
5	0.2017	C
3	0.1603	C
7	0.1223	C
1	0.1150	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0368  
Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 0.1258  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

NR\_Testemunha\_Arb,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.8493	A
4	0.4507	B
2	0.2950	BC
5	0.2643	BC
7	0.1743	C
1	0.1357	C
3	0.1233	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0770  
Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 0.2631  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	0.25772	0.04295
	27.55	0.0000	
Error	14	0.02183	0.00156
Total	20	0.27955	
Grand Mean	0.2312	CV 17.08	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	3.34
	0.0296
O'Brien's Test	1.48
	0.2539
Brown and Forsythe Test	0.59
	0.7346

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	69.76	0.0000
Error	6.0		

Component of variance for between groups 0.01380  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1140
2	0.3637
3	0.1633
4	0.2333
5	0.2140
6	0.4190
7	0.1110

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0228  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0322

NR\_Simples\_Arb,

**Completely Randomized AOV for NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	1.09181	0.18197
	56.41	0.0000	
Error	14	0.04516	0.00323
Total	20	1.13697	
Grand Mean	0.2888	CV 19.67	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	3.20
	0.0340
O'Brien's Test	1.42
	0.2734
Brown and Forsythe Test	1.12
	0.3994

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	19.35	0.0011
Error	6.0		

Component of variance for between groups 0.05958  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1340
2	0.2947
3	0.1340
4	0.2260
5	0.2153
6	0.8327
7	0.1847

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0328  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0464

Statistix 9.0

NR\_Simples\_Arb,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.4190	A
2	0.3637	A
4	0.2333	B
5	0.2140	BC
3	0.1633	BC
1	0.1140	C
7	0.1110	C

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.0322  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 0.1101  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different from  
one another.

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	0.15154	0.02526
	46.68	0.0000	
Error	14	0.00758	0.00054
Total	20	0.15912	
Grand Mean	0.2275	CV 10.23	

**Homogeneity of Variances** **F**  
**P**

Levene's Test	1.71
	0.1922
O'Brien's Test	0.76
	0.6141
Brown and Forsythe Test	0.54
	0.7730

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	42.55	0.0001
Error	6.0		

Component of variance for between  
groups 0.00824  
Effective cell size  
3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1277
2	0.2887
3	0.1627
4	0.2590
5	0.2377
6	0.3800
7	0.1367

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0134  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0190

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.8327	A
2	0.2947	B
4	0.2260	BC
5	0.2153	BC
7	0.1847	BC
1	0.1340	C
3	0.1340	C

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.0464  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 0.1584  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different from  
one another.

NR\_Dupla\_Arb,  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	0.89444	0.14907
	24.56	0.0000	
Error	14	0.08497	0.00607
Total	20	0.97942	
Grand Mean	0.2760	CV 28.23	

**Homogeneity of Variances** **F**  
**P**

Levene's Test	3.86
	0.0174
O'Brien's Test	1.72
	0.1895
Brown and Forsythe Test	2.52
	0.0722

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	10.80	0.0051
Error	6.1		

Component of variance for between  
groups 0.04767  
Effective cell size  
3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1407
2	0.2780
3	0.1347
4	0.2320
5	0.1897
6	0.7687
7	0.1880

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0450  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0636

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.3800	A
2	0.2887	B
4	0.2590	B
5	0.2377	B
3	0.1627	C
7	0.1367	C
1	0.1277	C

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.0190  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 0.0649  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different from  
one another.

NR\_Dupla\_Arb,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.7687	A
2	0.2780	B
4	0.2320	B
5	0.1897	B
7	0.1880	B
1	0.1407	B
3	0.1347	B

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.0636  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 0.2173  
There are 2 groups (A and B) in which  
the means  
are not significantly different from  
one another.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.93874	0.46937
	0.34	0.7221	
Error	6	8.18952	1.36492
Total	8	9.12826	
Grand Mean	6.2971	CV 18.55	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	1.35
	0.3286
O'Brien's Test	0.60
	0.5793
Brown and Forsythe Test	0.24
	0.7960

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.29	0.7641
Error		3.7	

Component of variance for between  
groups -0.29852  
Effective cell size  
3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	6.1723
Simples	6.7400
Testemunha	5.9790

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.6745  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.9539

GS\_1^data\_Arb

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.2372	0.11862
	0.06	0.9424	
Error	6	11.8856	1.98094
Total	8	12.1229	
Grand Mean	6.2434	CV 22.54	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	1.48
	0.2997
O'Brien's Test	0.66
	0.5511
Brown and Forsythe Test	0.29
	0.7553

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.08	0.9270
Error		3.3	

Component of variance for between  
groups -0.62077  
Effective cell size  
3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	6.4500
Simples	6.2270
Testemunha	6.0533

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.8126  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.1492



Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	5.1291	2.5646
	0.16	0.8535	
Error	6	94.5943	15.7657
Total	8	99.7234	
Grand Mean	19.040	CV 20.85	

**Homogeneity of Variances**

	F
P	
Levene's Test	0.81
	0.4874
O'Brien's Test	0.36
	0.7112
Brown and Forsythe Test	0.19
	0.8346

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.12	0.8895
Error		3.9	

Component of variance for between groups -4.40038  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	18.150
Simples	18.974
Testemunha	19.995

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 2.2924  
Std Error (Diff of 2 Means) 3.2420

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	3.61734	1.80867
	2.61	0.1528	
Error	6	4.15544	0.69257
Total	8	7.77278	
Grand Mean	8.8957	CV 9.36	

**Homogeneity of Variances**

	F
P	
Levene's Test	0.89
	0.4578
O'Brien's Test	0.40
	0.6890
Brown and Forsythe Test	0.13
	0.8781

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	3.02	0.1620
Error		3.9	

Component of variance for between groups 0.37203  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	9.1050
Simples	8.0360
Testemunha	9.5460

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.4805  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.6795

GS\_2ªdata\_Arb,

**Completely Randomized AOV for GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	33.720	16.8599
	1.22	0.3584	
Error	6	82.684	13.7807
Total	8	116.404	
Grand Mean	18.293	CV 20.29	

**Homogeneity of Variances**

	F
P	
Levene's Test	2.78
	0.1397
O'Brien's Test	1.24
	0.3551
Brown and Forsythe Test	0.31
	0.7421

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.90	0.4823
Error		3.6	

Component of variance for between groups 1.02639  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	16.284
Simples	17.688
Testemunha	20.908

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 2.1433  
Std Error (Diff of 2 Means) 3.0310

GS\_3ªdata\_Arb,

**Completely Randomized AOV for GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	5.2480	2.62401
	0.75	0.5138	
Error	6	21.1134	3.51891
Total	8	26.3614	
Grand Mean	9.0109	CV 20.82	

**Homogeneity of Variances**

	F
P	
Levene's Test	0.37
	0.7066
O'Brien's Test	0.16
	0.8527
Brown and Forsythe Test	0.03
	0.9673

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.54	0.6193
Error		3.9	

Component of variance for between groups -0.29830  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	8.246
Simples	8.733
Testemunha	10.054

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.0830  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.5316

Statistix 9.0

Completely Randomized AOV for GS_FOLHAS			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	138.074	69.0368
	28.19	0.0009	
Error	6	14.693	2.4488
Total	8	152.766	
Grand Mean	12.453	CV 12.57	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			1.90
	0.2300		
O'Brien's Test			0.84
	0.4758		
Brown and Forsythe Test			0.80
	0.4922		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	33.44	0.0107
Error		2.8	
Component of variance for between groups 22.1960			
Effective cell size 3.0			
MODALIDAD	Mean		
Dupla	12.128		
Simples	7.827		
Testemunha	17.405		
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		0.9035	
Std Error (Diff of 2 Means)		1.2777	

Statistix 9.0

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons			
Test of GS_FOLHAS by MODALIDAD			
MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups	
Testemunha	17.405	A	
Dupla	12.128	B	
Simples	7.8270	C	
Alpha	0.05	Standard	
Error for Comparison	1.2777		
Critical Q Value	4.341	Critical	
Value for Comparison	3.9223		
All 3 means are significantly different from one another.			

GS\_4ªdata\_Arb,

Completely Randomized AOV for GS_ORG_RE			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	298.963	149.481
	10.53	0.0109	
Error	6	85.155	14.193
Total	8	384.118	
Grand Mean	14.505	CV 25.97	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			3.38
	0.1037		
O'Brien's Test			1.50
	0.2955		
Brown and Forsythe Test			1.29
	0.3421		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	6.38	0.0874
Error		2.9	
Component of variance for between groups 45.0963			
Effective cell size 3.0			
MODALIDAD	Mean		
Dupla	9.458		
Simples	11.486		
Testemunha	22.572		
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		2.1751	
Std Error (Diff of 2 Means)		3.0760	

GS\_4ªdata\_Arb,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons			
Test of GS_ORG_RE by MODALIDAD			
MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups	
Testemunha	22.572	A	
Simples	11.486	B	
Dupla	9.4583	B	
Alpha	0.05	Standard	
Error for Comparison	3.0760		
Critical Q Value	4.341	Critical	
Value for Comparison	9.4428		
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.			

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.55331	0.27665
	0.30	0.7524	
Error	6	5.56239	0.92707
Total	8	6.11570	
Grand Mean	7.5351	CV 12.78	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.26
	0.1851
O'Brien's Test	1.01
	0.4198
Brown and Forsythe Test	0.38
	0.6994

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.50	0.6424
Error		3.7	

Component of variance for between groups -0.21680  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	7.8847
Simples	7.3363
Testemunha	7.3843

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.5559  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.7862

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.74384	0.37192
	0.39	0.6906	
Error	6	5.66259	0.94377
Total	8	6.40644	
Grand Mean	9.6506	CV 10.07	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	1.15
	0.3790
O'Brien's Test	0.51
	0.6249
Brown and Forsythe Test	0.46
	0.6509

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.36	0.7211
Error		3.5	

Component of variance for between groups -0.19061  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	10.041
Simples	9.555
Testemunha	9.356

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.5609  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.7932

GS\_5ªdata\_Arb,  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	16.8648	8.43239
	1.44	0.3089	
Error	6	35.1896	5.86494
Total	8	52.0544	
Grand Mean	10.105	CV 23.97	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	0.43
	0.6691
O'Brien's Test	0.19
	0.8309
Brown and Forsythe Test	0.06
	0.9431

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.14	0.4072
Error		3.9	

Component of variance for between groups 0.85582  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	9.281
Simples	9.000
Testemunha	12.034

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.3982  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.9774

GS\_6ªdata\_Arb,  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	29.4070	14.7035
	2.44	0.1681	
Error	6	36.2216	6.0369
Total	8	65.6286	
Grand Mean	20.157	CV 12.19	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.30
	0.1818
O'Brien's Test	1.02
	0.4155
Brown and Forsythe Test	1.66
	0.2661

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	4.40	0.1416
Error		2.7	

Component of variance for between groups 2.88885  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	19.368
Simples	18.446
Testemunha	22.657

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.4186

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	1.97089	0.98544
	2.91	0.1310	
Error	6	2.03385	0.33898
Total	8	4.00474	
Grand Mean	5.7922	CV 10.05	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	0.18
	0.8362
O'Brien's Test	0.08
	0.9223
Brown and Forsythe Test	0.01
	0.9896

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	2.24	0.2228
Error		4.0	

Component of variance for between groups 0.21549  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	6.4540
Simples	5.4570
Testemunha	5.4657

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.3361  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.4754

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	585.495	97.5825
	20.26	0.0000	
Error	14	67.425	4.8161
Total	20	652.920	
Grand Mean	10.733	CV 20.45	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.45
	0.0262
O'Brien's Test	1.53
	0.2379
Brown and Forsythe Test	1.59
	0.2224

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	19.69	0.0010
Error		6.1	

Component of variance for between groups 30.9222  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	5.979
2	19.995
3	9.546
4	17.405
5	7.384
6	9.356

GS\_7ªdata\_Arb,  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.25887	0.12944
	0.12	0.8888	
Error	6	6.45836	1.07639
Total	8	6.71723	
Grand Mean	8.1619	CV 12.71	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	1.63
	0.2728
O'Brien's Test	0.72
	0.5234
Brown and Forsythe Test	0.23
	0.8015

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.16	0.8550
Error		3.7	

Component of variance for between groups -0.31565  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	8.3933
Simples	8.1007
Testemunha	7.9917

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.5990  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.8471

GS\_Testemunha\_Arb,  
7 5.466

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.2670  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.7918

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	936.67	156.112
	13.14	0.0000	
Error	14	166.27	11.876
Total	20	1102.94	

Grand Mean 14.610 CV 23.59

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.78
	0.0538
O'Brien's Test	1.24
	0.3458
Brown and Forsythe Test	0.70
	0.6574

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	184.80	0.0000
Error		5.5	

Component of variance for between groups 48.0784  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	6.053

2	20.908
3	10.054
4	22.572
5	12.034
6	22.657

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	19.995	A
4	17.405	A
3	9.5460	B
6	9.3563	B
5	7.3843	B
1	5.9790	B
7	5.4657	B

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 1.7918  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 6.1218  
There are 2 groups (A and B) in which  
the means  
are not significantly different from  
one another.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	367.199	61.1998
Error	14	28.274	2.0196
Total	20	395.473	
Grand Mean	9.1321	CV 15.56	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.45
O'Brien's Test	1.53
Brown and Forsythe Test	1.63

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	10.86	0.0051
Error	6.0		

Component of variance for between  
groups 19.7267  
Effective cell size  
3.0

COLHEITA	Mean
1	6.740
2	18.974
3	8.036
4	7.827
5	7.336
6	9.555
7	5.457

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.8205  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.1603

**Completely Randomized AOV for**

7	7.992
---	-------

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.9897  
Std Error (Diff of 2 Means) 2.8138

GS\_Testemunha\_Arb,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	22.657	A
4	22.572	A
2	20.908	AB
5	12.034	BC
3	10.054	C
7	7.9917	C
1	6.0533	C

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 2.8138  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 9.6134  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different from  
one another.

GS\_Simples\_Arb,

**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	419.118	69.8529
Error	14	65.488	4.6777
Total	20	484.606	
Grand Mean	11.383	CV 19.00	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	0.70
O'Brien's Test	0.31
Brown and Forsythe Test	0.16

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	9.22	0.0073
Error	6.2		

Component of variance for between  
groups 21.7251  
Effective cell size  
3.0

COLHEITA	Mean
1	6.227
2	17.688
3	8.733
4	11.486
5	9.000
6	18.446
7	8.101

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.2487  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.7659

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	18.974	A
6	9.5547	B
3	8.0360	BC
4	7.8270	BC
5	7.3363	BC
1	6.7400	BC
7	5.4570	C

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 1.1603  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 3.9643  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different from  
one another.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	310.342	51.7236
	18.48	0.0000	
Error	14	39.192	2.7994
Total	20	349.534	
Grand Mean	9.9906	CV 16.75	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.17
	0.0352
O'Brien's Test	1.41
	0.2783
Brown and Forsythe Test	1.21
	0.3559

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	9.31	0.0073
Error		6.1	

Component of variance for between  
groups 16.3081  
Effective cell size  
3.0

COLHEITA	Mean
1	6.172
2	18.150
3	9.105
4	12.128
5	7.885
6	10.041
7	6.454

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.9660  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.3661

GS\_Simples\_Arb,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	18.446	A
2	17.688	A
4	11.486	B
5	9.0000	B
3	8.7327	B
7	8.1007	B
1	6.2270	B

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 1.7659  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 6.0333  
There are 2 groups (A and B) in which  
the means  
are not significantly different from  
one another.

GS\_Dupla\_Arb,

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	414.978	69.1629
	20.62	0.0000	
Error	14	46.950	3.3536
Total	20	461.928	
Grand Mean	11.069	CV 16.54	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.53
	0.0718
O'Brien's Test	1.12
	0.3983
Brown and Forsythe Test	0.95
	0.4909

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	13.35	0.0029
Error		6.1	

Component of variance for between  
groups 21.9364  
Effective cell size  
3.0

COLHEITA	Mean
1	6.450
2	16.284
3	8.246
4	9.458
5	9.281
6	19.368
7	8.393

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.0573  
Std Error (Diff of 2 Means) 1.4952

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	18.150	A
4	12.128	B
6	10.041	BC
3	9.1050	BC
5	7.8847	BC
7	6.4540	C
1	6.1723	C

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 1.3661  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 4.6674  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in  
 which the means  
 are not significantly different from  
 one another.

GS\_Dupla\_Arb,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	19.368	A
2	16.284	A
4	9.4583	B
5	9.2807	B
7	8.3933	B
3	8.2463	B
1	6.4500	B

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 1.4952  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 5.1085  
 There are 2 groups (A and B) in which  
 the means  
 are not significantly different from  
 one another.

(resultados da análise estatística para a cultivar Cobrançosa)

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for NRFOLHAS**

Source	DF	SS	MS
MODALIDAD	2	0.00078	3.898E-04
	1.00	0.4216	
Error	6	0.00234	3.894E-04
Total	8	0.00312	
Grand Mean	0.1264	CV 15.61	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	3.06
	0.1212
O'Brien's Test	1.36
	0.3256
Brown and Forsythe Test	0.74
	0.5143

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	2.34	0.2508
Error		2.8	

Component of variance for between  
 groups 1.111E-07  
 Effective cell size  
 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.1320
Simples	0.1133
Testemunha	0.1340

Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.0114  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0161

NR\_1ªdata\_Cob

**Completely Randomized AOV for NRORG\_REP**

Source	DF	SS	MS
MODALIDAD	2	0.00056	2.796E-04
	1.55	0.3002	
Error	5	0.00090	1.809E-04
Total	7	0.00146	
Grand Mean	0.1184	CV 11.36	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	2.66
	0.1637
O'Brien's Test	M
	M
Brown and Forsythe Test	1.44
	0.3217

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	2.36	0.3154
Error		1.8	

Component of variance for between  
 groups 3.759E-05  
 Effective cell size  
 2.6

MODALIDAD	N	Mean	SE
Dupla	2	0.1040	9.51E-03
Simples	3	0.1243	7.77E-03
Testemunha	3	0.1220	7.77E-03

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00923	0.00462
	2.20	0.1915	
Error	6	0.01256	0.00209
Total	8	0.02179	
Grand Mean	0.2874	CV 15.92	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.10
	0.2038
O'Brien's Test	0.93
	0.4440
Brown and Forsythe Test	0.72
	0.5240

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.30	0.3769
Error		3.6	

Component of variance for between groups 8.406E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.2670
Simples	0.2627
Testemunha	0.3327

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0264  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0374

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00441	0.00220
	2.36	0.1757	
Error	6	0.00561	0.00094
Total	8	0.01002	
Grand Mean	0.2662	CV 11.49	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.57
	0.0951
O'Brien's Test	1.59
	0.2796
Brown and Forsythe Test	0.71
	0.5293

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	11.54	0.0274
Error		3.6	

Component of variance for between groups 4.228E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.2837
Simples	0.2800
Testemunha	0.2350

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0177  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0250

NR\_2ªdata\_Cob  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00245	0.00122
	0.20	0.8245	
Error	6	0.03687	0.00615
Total	8	0.03932	
Grand Mean	0.3289	CV 23.84	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	1.09
	0.3961
O'Brien's Test	0.48
	0.6394
Brown and Forsythe Test	0.41
	0.6816

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.23	0.8027
Error		3.6	

Component of variance for between groups -0.00164  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.3350
Simples	0.3063
Testemunha	0.3453

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0453  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0640

NR\_3ªdata\_Cob,  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.02347	0.01173
	3.83	0.0847	
Error	6	0.01838	0.00306
Total	8	0.04185	
Grand Mean	0.2836	CV 19.52	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.37
	0.1044
O'Brien's Test	1.50
	0.2966
Brown and Forsythe Test	0.48
	0.6427

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	3.13	0.1703
Error		3.4	

Component of variance for between groups 0.00289  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.2317
Simples	0.2660
Testemunha	0.3530

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0320



Std Error (Diff of 2 Means) 0.0452

Statistix 9.0			
Completely Randomized AOV for			
NR_FOLHAS			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00205	0.00102
	0.98	0.4292	
Error	6	0.00629	0.00105
Total	8	0.00834	
Grand Mean	0.2358	CV 13.73	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			2.15
	0.1976		
O'Brien's Test			0.96
	0.4362		
Brown and Forsythe Test			0.26
	0.7824		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.74	0.2942
Error		3.7	
Component of variance for between groups -8.037E-06			
Effective cell size			
3.0			
MODALIDAD		Mean	
Dupla		0.2397	
Simples		0.2157	
Testemunha		0.2520	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			0.0187
Std Error (Diff of 2 Means)			0.0264

Statistix 9.0			
Completely Randomized AOV for			
NR_FOLHAS			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00363	0.00181
	0.65	0.5535	
Error	6	0.01664	0.00277
Total	8	0.02027	
Grand Mean	0.1791	CV 29.40	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			3.73
	0.0887		
O'Brien's Test			1.66
	0.2674		
Brown and Forsythe Test			1.10
	0.3931		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.35	0.7295
Error		3.5	
Component of variance for between groups -3.201E-04			
Effective cell size			
3.0			
MODALIDAD		Mean	
Dupla		0.2073	
Simples		0.1623	
Testemunha		0.1677	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			0.0304

NR_4ªdata_Cob,			
Completely Randomized AOV for			
NR_ORG_RE			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00105	0.00052
	0.46	0.6521	
Error	6	0.00685	0.00114
Total	8	0.00790	
Grand Mean	0.2283	CV 14.80	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			1.59
	0.2794		
O'Brien's Test			0.71
	0.5304		
Brown and Forsythe Test			0.69
	0.5395		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.28	0.7704
Error		3.1	
Component of variance for between groups -2.056E-04			
Effective cell size			
3.0			
MODALIDAD		Mean	
Dupla		0.2173	
Simples		0.2247	
Testemunha		0.2430	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			0.0195
Std Error (Diff of 2 Means)			0.0276

NR_5ªdata_Cob,			
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0430			
Completely Randomized AOV for			
NR_ORG_RE			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00167	8.354E-04
	1.26	0.3482	
Error	6	0.00396	6.608E-04
Total	8	0.00564	
Grand Mean	0.1592	CV 16.14	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			0.70
	0.5335		
O'Brien's Test			0.31
	0.7441		
Brown and Forsythe Test			0.10
	0.9083		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.20	0.3949
Error		3.8	
Component of variance for between			
groups 5.822E-05			
Effective cell size			
3.0			
MODALIDAD		Mean	
Dupla		0.1730	
Simples		0.1407	
Testemunha		0.1640	
Observations per Mean			3

Standard Error of a Mean 0.0148

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0210

Statistix 9.0  
Completely Randomized AOV for  
NR\_FOLHAS

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.02147	0.01073
	10.02	0.0122	
Error	6	0.00643	0.00107
Total	8	0.02789	
Grand Mean	0.5074	CV 6.45	

Homogeneity of Variances F

	P
Levene's Test	2.04
	0.2112
O'Brien's Test	0.91
	0.4532
Brown and Forsythe Test	1.56
	0.2839

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	16.31	0.0309
Error		2.7	

Component of variance for between groups 0.00322  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.5363
Simples	0.4387
Testemunha	0.5473

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0189  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0267

NR\_6^data\_Cob,  
Completely Randomized AOV for  
NR\_ORG\_RE

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.00908	0.00454
	0.58	0.5893	
Error	6	0.04712	0.00785
Total	8	0.05620	
Grand Mean	0.6292	CV 14.08	

Homogeneity of Variances F

	P
Levene's Test	0.64
	0.5579
O'Brien's Test	0.29
	0.7608
Brown and Forsythe Test	0.12
	0.8886

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.48	0.6506
Error		3.8	

Component of variance for between groups -0.00110  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.6100
Simples	0.6037
Testemunha	0.6740

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0512  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0724

Statistix 9.0  
Tukey HSD All-Pairwise Comparisons  
Test of NR\_FOLHAS by MODALIDAD

MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups
Testemunha	0.5473	A
Dupla	0.5363	A
Simples	0.4387	B
Alpha	0.05	Standard
Error for Comparison	0.0267	
Critical Q Value	4.341	Critical
Value for Comparison	0.0820	

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

NR\_6^data\_Cob,  
Tukey HSD All-Pairwise Comparisons  
Test of NR\_ORG\_RE by MODALIDAD

MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups
Testemunha	0.6740	A
Dupla	0.6100	A
Simples	0.6037	A
Alpha	0.05	Standard
Error for Comparison	0.0724	
Critical Q Value	4.341	Critical
Value for Comparison	0.2221	

There are no significant pairwise differences among the means.

Statistix 9.0  
Completely Randomized AOV for  
NR\_FOLHAS

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.01229	0.00615
	1.66	0.2673	
Error	6	0.02225	0.00371
Total	8	0.03454	
Grand Mean	0.1166	CV 52.25	

Homogeneity of Variances F P

Levene's Test	1.64 0.2701
O'Brien's Test	0.73 0.5206
Brown and Forsythe Test	0.26 0.7775

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2	0.01229	0.00615
Error	6	0.02225	0.00371

NR\_7^data\_Cob,  
MODALIDAD 2.0 2.26 0.2335  
Error 3.5  
Component of variance for between groups 8.123E-04  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	0.1250
Simples	0.0677
Testemunha	0.1570

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.0352  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0497

Completely Randomized AOV for  
NR\_ORG\_RE

Source	DF	SS	MS
--------	----	----	----

	<b>F</b>	<b>P</b>	
MODALIDAD	2	0.00351	0.00175
	1.08	0.3976	
Error	6	0.00974	0.00162
Total	8	0.01325	
Grand Mean	0.1334	CV 30.20	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
	<b>P</b>		
Levene's Test		3.49	
	0.0988		
O'Brien's Test		1.55	
	0.2865		
Brown and Forsythe Test		1.46	
	0.3034		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			

Statistix 9.0  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
	<b>F</b>	<b>P</b>	
COLHEITA	6	0.37061	0.06177
	50.31	0.0000	
Error	14	0.01719	0.00123
Total	20	0.38780	
Grand Mean	0.2608	CV 13.44	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
	<b>P</b>		
Levene's Test		2.45	
	0.0784		
O'Brien's Test		1.09	
	0.4151		
Brown and Forsythe Test		0.85	
	0.5521		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
COLHEITA	6.0	34.99	0.0002
Error		6.0	
Component of variance for between groups		0.02018	
Effective cell size		3.0	
<b>COLHEITA</b>	<b>Mean</b>		
1	0.1340		
2	0.3327		
3	0.2350		
4	0.2520		
5	0.1677		
6	0.5473		
7	0.1570		
Observations per Mean		3	
Standard Error of a Mean		0.0202	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0286	

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
MODALIDAD	2.0	0.77	0.5371
Error		3.1	
Component of variance for between groups		4.319E-05	
Effective cell size		3.0	
<b>MODALIDAD</b>	<b>Mean</b>		
Dupla	0.1537		
Simple	0.1400		
Testemunha	0.1067		
Observations per Mean		3	
Standard Error of a Mean		0.0233	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0329	

NR\_Testemunha\_Cob,  
**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
	<b>F</b>	<b>P</b>	
COLHEITA	6	0.70301	0.11717
	25.04	0.0000	
Error	14	0.06552	0.00468
Total	20	0.76853	
Grand Mean	0.2869	CV 23.85	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
	<b>P</b>		
Levene's Test		1.68	
	0.1977		
O'Brien's Test		0.75	
	0.6210		
Brown and Forsythe Test		0.51	
	0.7910		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
COLHEITA	6.0	15.27	0.0021
Error		6.0	
Component of variance for between groups		0.03750	
Effective cell size		3.0	
<b>COLHEITA</b>	<b>Mean</b>		
1	0.1220		
2	0.3453		
3	0.3530		
4	0.2430		
5	0.1640		
6	0.6740		
7	0.1067		
Observations per Mean		3	
Standard Error of a Mean		0.0395	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0559	

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.5473	A
2	0.3327	B
4	0.2520	BC
3	0.2350	BC
5	0.1677	CD
7	0.1570	CD
1	0.1340	D

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 0.0286  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 0.0977  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in  
 which the means  
 are not significantly different from  
 one another.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	0.27349	0.04558
	43.93	0.0000	
Error	14	0.01453	0.00104
Total	20	0.28801	
Grand Mean	0.2200	CV 14.64	

**Homogeneity of Variances** **F**  
**P**

Levene's Test		2.78
	0.0540	
O'Brien's Test		1.23
	0.3464	
Brown and Forsythe Test		0.53
	0.7778	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	1387.69	0.0000
Error		5.9	

Component of variance for between  
 groups 0.01485  
 Effective cell size  
 3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1133
2	0.2627
3	0.2800
4	0.2157
5	0.1623
6	0.4387
7	0.0677

Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.0186  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0263  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0377

NR\_Testemunha\_Cob,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.6740	A
3	0.3530	B
2	0.3453	B
4	0.2430	BC
5	0.1640	BC
1	0.1220	C
7	0.1067	C

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 0.0559  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 0.1908  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in  
 which the means  
 are not significantly different from  
 one another.

NR\_Simples\_Cob,

**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	0.50566	0.08428
	39.45	0.0000	
Error	14	0.02991	0.00214
Total	20	0.53557	
Grand Mean	0.2580	CV 17.92	

**Homogeneity of Variances** **F**  
**P**

Levene's Test		3.46
	0.0262	
O'Brien's Test		1.54
	0.2375	
Brown and Forsythe Test		1.23
	0.3489	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	36.76	0.0004
Error		5.3	

Component of variance for between  
 groups 0.02738  
 Effective cell size  
 3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1243
2	0.3063
3	0.2660
4	0.2247
5	0.1407
6	0.6037
7	0.1400

Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.0267

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.4387	A
3	0.2800	B
2	0.2627	B
4	0.2157	BC
5	0.1623	CD
1	0.1133	DE
7	0.0677	E

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 0.0263  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 0.0899  
 There are 5 groups (A, B, etc.) in  
 which the means  
 are not significantly different from  
 one another

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	0.34394	0.05732
	19.86	0.0000	
Error	14	0.04040	0.00289
Total	20	0.38434	
Grand Mean	0.2559	CV 21.00	

**Homogeneity of Variances** **F**  
**P**

Levene's Test		2.30
	0.0937	
O'Brien's Test		1.02
	0.4510	
Brown and Forsythe Test		0.59
	0.7339	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	37.51	0.0002
Error	6.0		

Component of variance for between  
 groups 0.01815  
 Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	0.1320
2	0.2670
3	0.2837
4	0.2397
5	0.2073
6	0.5363
7	0.1250

Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.0310  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0439

NR\_Simples\_Cob,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.6037	A
2	0.3063	B
3	0.2660	BC
4	0.2247	BCD
5	0.1407	CD
7	0.1400	CD
1	0.1243	D

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 0.0377  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 0.1289  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in  
 which the means  
 are not significantly different from  
 one another.

NR\_Dupla\_Cob,

**Completely Randomized AOV for**  
**NR\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	0.49610	0.08268
	37.85	0.0000	
Error	13	0.02840	0.00218
Total	19	0.52450	
Grand Mean	0.2685	CV 17.41	

**Homogeneity of Variances** **F**  
**P**

Levene's Test		2.53
	0.0757	
O'Brien's Test		M
	M	
Brown and Forsythe Test		1.27
	0.3375	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	27.02	0.0006
Error	5.7		

Component of variance for between  
 groups 0.02825  
 Effective cell size 2.9

COLHEITA	N	Mean	SE
1	2	0.1040	0.0331
2	3	0.3350	0.0270
3	3	0.2317	0.0270
4	3	0.2173	0.0270
5	3	0.1730	0.0270
6	3	0.6100	0.0270
7	3	0.1537	0.0270

Statistix 9.0  
NR\_Dupla\_Cob,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.5363	A
3	0.2837	B
2	0.2670	BC
4	0.2397	BC
5	0.2073	BC
1	0.1320	C
7	0.1250	C

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.0439  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 0.1499  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different from

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
MODALIDAD	2	28.5433	14.2716
	5.89	0.0384	
Error	6	14.5298	2.4216
Total	8	43.0731	
Grand Mean	6.5872	CV 23.62	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.55
	0.0963
O'Brien's Test	1.58
	0.2818
Brown and Forsythe Test	0.66
	0.5488

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	6.43	0.0666
Error		3.5	

Component of variance for between  
groups 3.95001  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	4.6193
Simples	6.2100
Testemunha	8.9323

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.8984

Statistix 9.0  
**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by MODALIDAD**

MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups
Testemunha	8.9323	A
Simples	6.2100	AB
Dupla	4.6193	B

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 1.2706  
Critical Q Value 4.341 Critical  
Value for Comparison 3.9005  
There are 2 groups (A and B) in which  
the means are not significantly

one another.  
**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of NR\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	0.6100	A
2	0.3350	B
3	0.2317	BC
4	0.2173	BC
5	0.1730	C
7	0.1537	C
1	0.1040	C

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.0382 TO 0.0427  
Critical Q Value 4.883 Critical  
Value for Comparison 0.1318 TO 0.1473  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different from  
one another.

GS\_1ªdata\_Cob

Std Error (Diff of 2 Means) 1.2706  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
MODALIDAD	2	1.88860	0.94430
	1.43	0.3228	
Error	5	3.30243	0.66049
Total	7	5.19104	
Grand Mean	4.8940	CV 16.61	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.12
	0.2150
O'Brien's Test	M
	M
Brown and Forsythe Test	0.81
	0.4948

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	2.13	0.3018
Error		2.3	

Component of variance for between  
groups 0.10812  
Effective cell size 2.6

MODALIDAD	N	Mean	SE
Dupla	2	4.1480	0.5747
Simples	3	4.8830	0.4692
Testemunha	3	5.4023	0.4692

GS\_1ªdata\_Cob  
different from one another.  
**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_ORG\_RE by MODALIDAD**

MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups
Testemunha	5.4023	A
Simples	4.8830	A
Dupla	4.1480	A

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.6636 TO 0.7419  
Critical Q Value 4.604 Critical  
Value for Comparison 2.1603 TO 2.4153  
There are no significant pairwise

differences among the means.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for GSFOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	29.6006	14.8003
	2.62	0.1524	
Error	6	33.9399	5.6566
Total	8	63.5405	
Grand Mean	15.086	CV 15.77	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
	P		
Levene's Test			2.15
	0.1976		
O'Brien's Test			0.96
	0.4361		
Brown and Forsythe Test			1.50
	0.2969		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	4.41	0.1420
Error		2.7	
Component of variance for between groups 3.04789			
Effective cell size 3.0			
	<b>MODALIDAD</b>	<b>Mean</b>	
	Dupla	15.690	
	Simples	12.625	
	Testemunha	16.942	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			1.3732
Std Error (Diff of 2 Means)			1.9419

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	2.2819	1.14097
	0.73	0.5186	
Error	6	9.3276	1.55460
Total	8	11.6095	
Grand Mean	7.6566	CV 16.28	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
	P		
Levene's Test			2.86
	0.1344		
O'Brien's Test			1.27
	0.3470		
Brown and Forsythe Test			1.09
	0.3937		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.43	0.6820
Error		3.7	
Component of variance for between groups -0.13788			
Effective cell size 3.0			
	<b>MODALIDAD</b>	<b>Mean</b>	
	Dupla	8.3540	
	Simples	7.1833	
	Testemunha	7.4323	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			0.7199

GS\_2ªdata\_Cob

**Completely Randomized AOV for GSORG\_REP**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	22.8242	11.4121
	4.72	0.0586	
Error	6	14.5011	2.4169
Total	8	37.3253	
Grand Mean	11.504	CV 13.51	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
	P		
Levene's Test			1.12
	0.3874		
O'Brien's Test			0.50
	0.6321		
Brown and Forsythe Test			0.20
	0.8211		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	4.82	0.0895
Error		3.8	
Component of variance for between groups 2.99841			
Effective cell size 3.0			
	<b>MODALIDAD</b>	<b>Mean</b>	
	Dupla	10.238	
	Simples	10.525	
	Testemunha	13.750	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			0.8976
Std Error (Diff of 2 Means)			1.2693

GS\_3ªdata\_Cob

Std Error (Diff of 2 Means) 1.0180

**Completely Randomized AOV for GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	10.7933	5.39666
	9.96	0.0124	
Error	6	3.2506	0.54177
Total	8	14.0440	
Grand Mean	6.5538	CV 11.23	
<b>Homogeneity of Variances</b>			<b>F</b>
	P		
Levene's Test			2.20
	0.1916		
O'Brien's Test			0.98
	0.4285		
Brown and Forsythe Test			0.58
	0.5873		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	5.59	0.1021
Error		2.9	
Component of variance for between groups 1.61829			
Effective cell size 3.0			
	<b>MODALIDAD</b>	<b>Mean</b>	
	Dupla	5.1523	
	Simples	6.6837	

Testemunha 7.8253  
Observations per Mean 3

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by MODALIDAD**

MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups
Dupla	8.3540	A
Testemunha	7.4323	A
Simples	7.1833	A
Alpha	0.05	Standard
Error for Comparison	1.0180	
Critical Q Value	4.341	Critical
Value for Comparison	3.1252	
There are no significant pairwise differences among the means.		

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
MODALIDAD	2	0.59917	0.29958
		0.83	0.4814
Error	6	2.17126	0.36188
Total	8	2.77043	
Grand Mean	6.3249	CV 9.51	

**Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test	0.2352	1.86
O'Brien's Test	0.4818	0.83
Brown and Forsythe Test	0.8634	0.15

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.64	0.5753
Error		3.8	
Component of variance for between groups		-0.02076	
Effective cell size		3.0	

MODALIDAD	Mean
Dupla	6.3563
Simples	6.6240
Testemunha	5.9943

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.3473  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.4912

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
MODALIDAD	2	1.86714	0.93357
		2.46	0.1658
Error	6	2.27622	0.37937
Total	8	4.14336	
Grand Mean	8.0387	CV 7.66	

**Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test		3.24

Standard Error of a Mean 0.4250  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.6010

GS\_3^data\_Cob

**Test of GS\_ORG\_RE by MODALIDAD**

MODALIDAD	Mean	Homogeneous Groups
Testemunha	7.8253	A
Simples	6.6837	AB
Dupla	5.1523	B
Alpha	0.05	Standard
Error for Comparison	0.6010	
Critical Q Value	4.341	Critical
Value for Comparison	1.8449	
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.		

GS\_4^data\_Cob

**Completely Randomized AOV for GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
MODALIDAD	2	0.94078	0.47039
		2.72	0.1443
Error	6	1.03754	0.17292
Total	8	1.97832	
Grand Mean	5.8369	CV 7.12	

**Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test	0.2071	2.07
O'Brien's Test	0.4482	0.92
Brown and Forsythe Test	0.4662	0.87

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	4.19	0.1497
Error		2.7	
Component of variance for between groups		0.09916	
Effective cell size		3.0	

MODALIDAD	Mean
Dupla	5.8763
Simples	5.4227
Testemunha	6.2117

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.2401  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.3395

GS\_5^data\_Cob

0.1114  
O'Brien's Test 1.44  
0.3089  
Brown and Forsythe Test 1.88  
0.2322

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	7.60	0.0785
Error		2.7	
Component of variance for between groups		0.18473	
Effective cell size			



3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	7.8847
Simples	7.5740
Testemunha	8.6573

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.3556  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.5029

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	1.54497	0.77248
Error	6	7.01917	1.16986
Total	8	8.56413	
Grand Mean	6.0731	CV 17.81	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	2.44

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	0.96214	0.48107
Error	6	1.96202	0.32700
Total	8	2.92416	
Grand Mean	8.6941	CV 6.58	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	3.49
O'Brien's Test	1.55
Brown and Forsythe Test	0.96

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.54	0.3551
Error		2.8	

Component of variance for between groups 0.05135  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	8.6527
Simples	9.1137
Testemunha	8.3160

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.3302  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.4669

0.1675

O'Brien's Test 1.09

0.3960

Brown and Forsythe Test 0.72

0.5253

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	0.43	0.6824
Error		3.3	

Component of variance for between groups -0.13246  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	5.7003
Simples	5.8680
Testemunha	6.6510

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.6245  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.8831

GS\_6ªdata\_Cob

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	41.6697	20.8349
Error	6	51.1855	8.5309
Total	8	92.8552	
Grand Mean	10.334	CV 28.26	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	3.44
O'Brien's Test	1.53
Brown and Forsythe Test	0.84

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	7.31	0.0598
Error		3.4	

Component of variance for between groups 4.10132  
Effective cell size 3.0

MODALIDAD	Mean
Dupla	11.530
Simples	7.313
Testemunha	12.160

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 1.6863  
Std Error (Diff of 2 Means) 2.3848

Statistix 9.0

Completely Randomized AOV for GS_FOLHAS			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	1.21667	0.60833
	1.03	0.4125	
Error	6	3.54352	0.59059
Total	8	4.76019	
Grand Mean	6.7123	CV 11.45	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			2.01
	0.2153		
O'Brien's Test			0.89
	0.4582		
Brown and Forsythe Test			1.72
	0.2560		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.52	0.3627
Error		2.7	
Component of variance for between groups		0.00592	
Effective cell size		3.0	
MODALIDAD		Mean	
Dupla		6.2987	
Simples		7.1920	
Testemunha		6.6463	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		0.4437	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.6275	

Statistix 9.0

Completely Randomized AOV for GS_FOLHAS			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	242.071	40.3452
	18.05	0.0000	
Error	14	31.295	2.2353
Total	20	273.366	
Grand Mean	8.9886	CV 16.63	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			2.85
			0.0501
O'Brien's Test			1.26
			0.3338
Brown and Forsythe Test			0.80
			0.5864
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	7.51	0.0134
Error		6.0	
Component of variance for between groups		12.7033	
Effective cell size		3.0	
COLHEITA		Mean	
1		8.932	
2		16.942	
3		7.432	
4		5.994	
5		8.657	
6		8.316	
7		6.646	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		0.8632	

GS\_7ªdata\_Cob

Completely Randomized AOV for GS_ORG_RE			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
MODALIDAD	2	2.69341	1.34670
	1.87	0.2334	
Error	6	4.31458	0.71910
Total	8	7.00799	
Grand Mean	8.9718	CV 9.45	
Homogeneity of Variances			F
	P		
Levene's Test			1.31
	0.3375		
O'Brien's Test			0.58
	0.5876		
Brown and Forsythe Test			0.41
	0.6823		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
MODALIDAD	2.0	1.14	0.4180
Error		3.4	
Component of variance for between groups		0.20920	
Effective cell size		3.0	
MODALIDAD		Mean	
Dupla		8.9707	
Simples		9.6423	
Testemunha		8.3023	
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean		0.4896	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.6924	

GS\_Testemunha\_Cob,

Std Error (Diff of 2 Means)	1.2207		
Completely Randomized AOV for			
GS_ORG_RE			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
COLHEITA	6	178.837	29.8061
	7.25	0.0011	
Error	14	57.553	4.1109
Total	20	236.390	
Grand Mean	8.6147	CV	23.54
Homogeneity of Variances			F
P			
Levene's Test			3.60
	0.0227		
O'Brien's Test			1.60
	0.2195		
Brown and Forsythe Test			0.97
	0.4793		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	14.40	0.0025
Error		6.0	
Component of variance for between			
groups		8.56505	
Effective cell size			
	3.0		
COLHEITA		Mean	
	1	5.402	
	2	13.750	
	3	7.825	

4	6.212
5	6.651
6	12.160
7	8.302

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	16.942	A
1	8.9323	B
5	8.6573	B
6	8.3160	B
3	7.4323	B
7	6.6463	B
4	5.9943	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.2207  
Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 4.1707  
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	87.5630	14.5938
Error	14	3.8069	0.2719
Total	20	91.3699	
Grand Mean	8.0745	CV 6.46	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	2.61
O'Brien's Test	1.16
Brown and Forsythe Test	0.76

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	370.93	0.0000
Error		5.8	

Component of variance for between groups 4.77397  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	6.210
2	12.625
3	7.183
4	6.624
5	7.574
6	9.114
7	7.192

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.3011  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.4258

**Completely Randomized AOV for**

Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	1.1706
Std Error (Diff of 2 Means)	1.6555

GS\_Testemunha\_Cob,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	13.750	A
6	12.160	AB
7	8.3023	ABC
3	7.8253	BC
5	6.6510	BC
4	6.2117	C
1	5.4023	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.6555  
Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 5.6560  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

GS\_Simples\_Cob,

**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	82.8032	13.8005
Error	14	13.4694	0.9621
Total	20	96.2726	
Grand Mean	7.1911	CV 13.64	

**Homogeneity of Variances**

	F
Levene's Test	1.75
O'Brien's Test	0.78
Brown and Forsythe Test	0.71

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	28.01	0.0007
Error		5.4	

Component of variance for between groups 4.27948  
Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	4.883
2	10.525
3	6.684
4	5.423
5	5.868
6	7.313
7	9.642

Observations per Mean 3  
Standard Error of a Mean 0.5663  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.8009

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	12.625	A
6	9.1137	B
5	7.5740	C
7	7.1920	C
3	7.1833	C
4	6.6240	C
1	6.2100	C

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 0.4258  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 1.4546  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in  
 which the means  
 are not significantly different from  
 one another.

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_FOLHAS**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	228.716	38.1194
Error	14	32.649	2.3320
Total	20	261.365	
Grand Mean	8.2651	CV 18.48	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	3.18
	0.0349
O'Brien's Test	1.41
	0.2770
Brown and Forsythe Test	1.68
	0.1987

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	22.17	0.0013
Error		5.4	

Component of variance for between  
 groups 11.9291  
 Effective cell size 3.0

COLHEITA	Mean
1	4.619
2	15.690
3	8.354
4	6.356
5	7.885
6	8.653
7	6.299

Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.8817Std

GS\_Simples\_Cob,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	10.525	A
7	9.6423	AB
6	7.3130	BC
3	6.6837	C
5	5.8680	C
4	5.4227	C
1	4.8830	C

Alpha 0.05 Standard  
 Error for Comparison 0.8009  
 Critical Q Value 4.832 Critical  
 Value for Comparison 2.7362  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in  
 which the means  
 are not significantly different from  
 one another.

GS\_Dupla\_Cob,

Error (Diff of 2 Means) 1.2469  
**Completely Randomized AOV for**  
**GS\_ORG\_RE**

Source	DF	SS	MS
COLHEITA	6	134.303	22.3838
Error	13	13.588	1.0453
Total	19	147.891	
Grand Mean	7.5349	CV 13.57	

**Homogeneity of Variances** **F**

	P
Levene's Test	2.69
	0.0634
O'Brien's Test	M
	M
Brown and Forsythe Test	0.71
	0.6461

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
COLHEITA	6.0	23.27	0.0013
Error		5.3	

Component of variance for between  
 groups 7.48722  
 Effective cell size 2.9

COLHEITA	N	Mean	SE
1	2	4.148	0.7229
2	3	10.238	0.5903
3	3	5.152	0.5903
4	3	5.876	0.5903
5	3	5.700	0.5903
6	3	11.530	0.5903
7	3	8.971	0.5903

Statistix 9.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_FOLHAS by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
2	15.690	A
6	8.6527	B
3	8.3540	B
5	7.8847	B
4	6.3563	B
7	6.2987	B
1	4.6193	B

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 1.2469  
Critical Q Value 4.832 Critical  
Value for Comparison 4.2599  
There are 2 groups (A and B) in which  
the means  
are not significantly different from  
one another.

GS\_Dupla\_Cob,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**  
**Test of GS\_ORG\_RE by COLHEITA**

COLHEITA	Mean	Homogeneous Groups
6	11.530	A
2	10.238	A
7	8.9707	A
4	5.8763	B
5	5.7003	B
3	5.1523	B
1	4.1480	B

Alpha 0.05 Standard  
Error for Comparison 0.8348 TO 0.9333  
Critical Q Value 4.883 Critical  
Value for Comparison 2.8821 TO 3.2223  
There are 2 groups (A and B) in which  
the means  
are not significantly different from  
one another.

## **Anexo 2**

(Resultados das análises estatísticas do valores de SPAD das cv. Arbequina e  
Cobrançosa)

Statistix 9.0

# **Completely Randomized AOV for SPAD**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
data	3	4488.9	1496.31
	10.25	0.0000	
Error	116	16940.4	146.04
Total	119	21429.3	
Grand Mean	64.652	CV 18.69	

## **Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test	0.0027	4.99
O'Brien's Test	0.0034	4.82
Brown and Forsythe Test	0.0010	5.81

## **Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
data	3.0	12.24	0.0000
Error		63.3	
Component of variance for between groups		45.0091	
Effective cell size		30.0	
data	Mean		

Statistix 9.0

# **Completely Randomized AOV for SPAD**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
data	3	4772.0	1590.66
	11.30	0.0000	
Error	116	16335.0	140.82
Total	119	21107.0	
Grand Mean	62.043	CV 19.13	

## **Homogeneity of Variances**

	P	F
Levene's Test	0.0407	2.85
O'Brien's Test	0.0461	2.75
Brown and Forsythe Test	0.0378	2.90

## **Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
data	3.0	16.04	0.0000
Error		63.7	
Component of variance for between groups		48.3280	
Effective cell size		30.0	
data	Mean		
1	70.330		

SPAD\_TESTEMUNHA\_Arb,

1	72.447
2	63.433
3	55.630
4	67.100

Observations per Mean	30
Standard Error of a Mean	2.2063
Std Error (Diff of 2 Means)	3.1202

## **Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**

### **Test of SPAD by data**

data	Mean	Homogeneous Groups
1	72.447	A
4	67.100	AB
2	63.433	BC
3	55.630	C

Alpha 0.05

Standard Error for Comparison  
3.1202

Critical Q Value 3.687

Critical Value for Comparison  
8.1339

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

SPAD\_Simples\_Arb,

2	61.683
3	52.655
4	63.502

Observations per Mean	30
Standard Error of a Mean	2.1666
Std Error (Diff of 2 Means)	3.0640

## **Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**

### **Test of SPAD by data**

data	Mean	Homogeneous Groups
1	70.330	A
4	63.502	AB
2	61.683	B
3	52.655	C

Alpha 0.05

Standard Error for Comparison  
3.0640

Critical Q Value 3.687

Critical Value for Comparison  
7.9873

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 9.0

# **Completely Randomized AOV for SPAD**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
data	3	4419.3	1473.09
	12.47	0.0000	
Error	116	13699.6	118.10
Total	119	18118.9	
Grand Mean	63.880	CV 17.01	

## **Homogeneity of Variances**

Levene's Test	4.70
	0.0039
O'Brien's Test	4.54
	0.0048
Brown and Forsythe Test	4.85
	0.0033

## **Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
data	3.0	14.36	0.0000
Error	62.7		
Component of variance for between groups	45.1663		
Effective cell size	30.0		
data	Mean		

Statistix 9.0

SPAD\_1ªcolheita\_Arb,

# **Completely Randomized AOV for SPAD**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
tratament	2	68.96	34.4822
	0.43	0.6518	
Error	87	6975.66	80.1800
Total	89	7044.62	
Grand Mean	71.487	CV 12.53	

## **Homogeneity of Variances**

Levene's Test	0.86
	0.4286
O'Brien's Test	0.83
	0.4413
Brown and Forsythe Test	1.52
	0.2234

## **Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
tratament	2.0	0.36	0.7011
Error	56.8		
Component of variance for between groups	-1.52326		
Effective cell size	30.0		

tratament Mean

1	72.447
2	70.330
3	71.685

Observations per Mean	30
Standard Error of a Mean	1.6348
Std Error (Diff of 2 Means)	2.3120

SPAD\_Dupla\_Arb,

1	71.685
2	63.567
3	54.738
4	65.530

Observations per Mean	30
Standard Error of a Mean	1.9841
Std Error (Diff of 2 Means)	2.8059

## **Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**

### **Test of SPAD by data**

data	Mean	Homogeneous Groups
1	71.685	A
4	65.530	AB
2	63.567	B
3	54.738	C

Alpha 0.05

Standard Error for Comparison  
2.8059

Critical Q Value 3.687

Critical Value for Comparison  
7.3146

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 9.0

SPAD\_2ªdata\_Arb,

# **Completely Randomized AOV for SPAD**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
tratament	2	66.3	33.136
	0.17	0.8481	
Error	87	17469.9	200.803
Total	89	17536.1	
Grand Mean	62.894	CV 22.53	

## **Homogeneity of Variances**

Levene's Test	2.21
	0.1153
O'Brien's Test	2.14
	0.1241
Brown and Forsythe Test	1.34
	0.2685

## **Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
tratament	2.0	0.18	0.8342
Error	57.5		
Component of variance for between groups	-5.58890		
Effective cell size	30.0		

tratament Mean

1	63.433
2	61.683
3	63.567

Observations per Mean	30
Standard Error of a Mean	2.5872
Std Error (Diff of 2 Means)	3.6588



```

Statistix 9.0
SPAD_3\data,
Completely Randomized AOV for SPAD
Source      DF      SS      MS
            F      P
tratament   2      139.9   69.930
            0.53   0.5900
Error       87     11461.0  131.735
Total       89     11600.8

Grand Mean 54.341   CV 21.12
Homogeneity of Variances      F
P
Levene's Test                1.58
0.2117
O'Brien's Test              1.53
0.2232
Brown and Forsythe Test     1.54
0.2193
Welch's Test for Mean Differences
Source      DF      F      P
tratament   2.0     0.61   0.5447
Error       56.9
Component of variance for between
groups     -2.06018
Effective cell size
30.0
    tratament    Mean
      1    55.630
      2    52.655
      3    54.738
Observations per Mean          30
Standard Error of a Mean      2.0955
Std Error (Diff of 2 Means)  2.9635

```

```

Statistix 9.0
SPAD_4\data,
Completely Randomized AOV for SPAD
Source      DF      SS      MS
            F      P
tratament   2      195.3   97.635
            0.77   0.4673
Error       87     11068.5  127.224
Total       89     11263.8
Grand Mean 65.377   CV 17.25
Homogeneity of Variances      F
P
Levene's Test                4.14
0.0192
O'Brien's Test              4.00
0.0219
Brown and Forsythe Test     3.99
0.0220
Welch's Test for Mean Differences
Source      DF      F      P
tratament   2.0     0.70   0.5001
Error       56.6
Component of variance for between
groups     -0.98630
Effective cell size
30.0
    tratament    Mean
      1    67.100
      2    63.502
      3    65.530
Observations per Mean          30
Standard Error of a Mean      2.0593
Std Error (Diff of 2 Means)  2.9123

```

(resultados da análise estatística para a cultivar Cobrançosa)

```

Statistix 9.0
SPAD_Cobrançosa_test
Effective cell size
30.0
    data    Mean
      1    70.915
      2    58.840
      3    52.105
      4    56.595
Observations per Mean          30
Standard Error of a Mean      1.4612
Std Error (Diff of 2 Means)  2.0665
Tukey HSD All-Pairwise Comparisons
Test of SPAD by data
data      Mean  Homogeneous Groups
      1    70.915  A
      2    58.840  B
      4    56.595  BC
      3    52.105  C
Alpha                      0.05
Standard Error for Comparison
2.0665
Critical Q Value  3.687
Critical Value for Comparison

```

```

Statistix 9.0
SPAD_Cobrançosa_test
Effective cell size
30.0
    data    Mean
      1    70.915
      2    58.840
      3    52.105
      4    56.595
Observations per Mean          30
Standard Error of a Mean      1.4612
Std Error (Diff of 2 Means)  2.0665
Tukey HSD All-Pairwise Comparisons
Test of SPAD by data
data      Mean  Homogeneous Groups
      1    70.915  A
      2    58.840  B
      4    56.595  BC
      3    52.105  C
Alpha                      0.05
Standard Error for Comparison
2.0665
Critical Q Value  3.687
Critical Value for Comparison

```

5.3869  
There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for SPAD**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
data	3	3425.2	1141.74
	13.15	0.0000	
Error	116	10075.0	86.85
Total	119	13500.3	
Grand Mean	63.366	CV 14.71	

**Homogeneity of Variances F**

	P	
Levene's Test		2.78
	0.0442	
O'Brien's Test		2.68
	0.0499	
Brown and Forsythe Test		2.19
	0.0934	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
data	3.0	12.59	0.0000
Error		63.4	
Component of variance for between groups		35.1630	
Effective cell size		30.0	

data Mean

Statistix 9.0

**Completely Randomized AOV for SPAD**

Source	DF	SS	MS
	F	P	
data	3	8226.5	2742.16
	28.91	0.0000	
Error	116	11002.8	94.85
Total	119	19229.2	
Grand Mean	62.703	CV 15.53	

**Homogeneity of Variances F**

	P	
Levene's Test		2.61
	0.0551	
O'Brien's Test		2.52
	0.0618	
Brown and Forsythe Test		1.15
	0.3322	

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
data	3.0	30.44	0.0000
Error		62.3	
Component of variance for between groups		88.2435	
Effective cell size		30.0	

data Mean

1 75.383

are not significantly different  
from one another

SPAD\_Cobrançosa\_simples,

1	70.855
2	65.852
3	57.337
4	59.422

Observations per Mean 30

Standard Error of a Mean 1.7015

Std Error (Diff of 2 Means) 2.406

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**

**Test of SPAD by data**

data	Mean	Homogeneous Groups
1	70.855	A
2	65.852	A
4	59.422	B
3	57.337	B

Alpha 0.05

Standard Error for Comparison

2.4063

Critical Q Value 3.687

Critical Value for Comparison

6.2728

There are 2 groups (A and B) in  
which the means  
are not significantly different  
from one another.

SPAD\_Cobrançosa\_dupla

2	61.837
3	52.165
4	61.428

Observations per Mean 30

Standard Error of a Mean 1.7781

Std Error (Diff of 2 Means) 2.5146

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons**

**Test of SPAD by dat**

data	Mean	Homogeneous Groups
1	75.383	A
2	61.837	B
4	61.428	B
3	52.165	C

Alpha 0.05

Standard Error for Comparison

2.5146

Critical Q Value 3.687

Critical Value for Comparison

6.5552

There are 3 groups (A, B, etc.) in  
which the means  
are not significantly different  
from one another.

Statistix 9.0  
SPAD\_1^data\_Cob,

Completely Randomized AOV for SPAD			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
tratament	2	404.8	202.377
	1.60	0.2085	
Error	87	11027.5	126.753
Total		89	11432.3
Grand Mean	72.384	CV	15.55
Homogeneity of Variances			
	P		F
Levene's Test			0.77
	0.4673		
O'Brien's Test			0.74
	0.4797		
Brown and Forsythe Test			0.04
	0.9582		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
tratament	2.0	1.43	0.2485
Error		57.4	
Component of variance for between groups		2.52079	
Effective cell size		30.0	
	tratament	Mean	
	1	70.915	
	2	70.855	
	3	75.383	
Observations per Mean			30
Standard Error of a Mean			2.0555
Std Error (Diff of 2 Means)			2.9069

Statistix 9.0

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of SPAD by tratament

tratament	Mean	Homogeneous Groups
2	65.852	A
3	61.837	AB
1	58.840	B
Alpha	0.05	Standard Error for Comparison
Critical Q Value	3.373	Critical Value for Comparison
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.		

Statistix 9.0

Completely Randomized AOV for SPAD			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
tratament	2	541.20	270.600
	6.28	0.0028	
Error	87	3751.72	43.123
Total		89	4292.92
Grand Mean	53.869	CV	12.19
Homogeneity of Variances			
	P		F
Levene's Test			0.16
	0.8564		

Statistix 9.0  
SPAD\_2^data,

Completely Randomized AOV for SPAD			
Source	DF	SS	MS
	F	P	
tratament	2	742.64	371.319
	4.13	0.0193	
Error	87	7818.72	89.870
Total		89	8561.36
Grand Mean	62.176	CV	15.25
Homogeneity of Variances			
	P		F
Levene's Test			0.64
	0.5313		
O'Brien's Test			0.61
	0.5430		
Brown and Forsythe Test			1.08
	0.3428		
Welch's Test for Mean Differences			
Source	DF	F	P
tratament	2.0	4.27	0.0186
Error		57.5	
Component of variance for between groups		9.38161	
Effective cell size		30.0	
	tratament	Mean	
	1	58.840	
	2	65.852	
	3	61.837	
Observations per Mean			30
Standard Error of a Mean			1.7308
Std Error (Diff of 2 Means)			2.4477

SPAD\_2^data

SPAD\_3^data,

O'Brien's Test			0.15
	0.8610		
Brown and Forsythe Test			0.04
	0.9646		
<b>Welch's Test for Mean Differences</b>			
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
tratament	2.0	5.92	0.0046
Error		57.9	
Component of variance for between groups		7.58257	
Effective cell size		30.0	

<b>tratament</b>	<b>Mean</b>	Observations per Mean	30
1	52.105	Standard Error of a Mean	1.1989
2	57.337	Std Error (Diff of 2 Means)	1.6955
3	52.165		

Statistix 9.0

SPAD\_3<sup>a</sup>data,

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of SPAD by tratament**

<b>tratament</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
2	57.337	A
3	52.165	B
1	52.105	B

Alpha	0.05	Standard Error for Comparison	1.6955
Critical Q Value	3.373	Critical Value for Comparison	4.0436
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.			

Statistix 9.0

SPAD\_4<sup>a</sup>data\_Cob,

**Completely Randomized AOV for SPAD**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
tratament	2	353.78	176.889	2.60	0.0797
Error	87	5910.16	67.933		
Total	89	6263.94			
Grand Mean	59.148	CV	13.93		

**Homogeneity of Variances**

	<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test	1.35	0.2636
O'Brien's Test	1.31	0.2759
Brown and Forsythe Test	0.80	0.4531

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
tratament	2.0	2.71	0.0750
Error	57.2		

Component of variance for between groups 3.63188  
Effective cell size 30.0

<b>tratament</b>	<b>Mean</b>
1	56.595
2	59.422
3	61.428

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 1.5048  
Std Error (Diff of 2 Means) 2.1281

### **Anexo 3**

(Escala de classificação BBCH dos estados fenológicos da oliveira (adaptada por Sanz-Cortés et al., 2002))

Descrição dos estados fenológicos da escala BBCH da oliveira (Sanz-Cortés *et al.*, 2002):

Estado principal de crescimento 0: desenvolvimento das gemas

00 – As gemas situadas no ápice dos lançamentos do ano anterior estão completamente fechadas e são pontiagudas, sem pedúnculo e de cor ocre.

01 – As gemas foliares começam a inchar e a abrir, sendo visíveis os novos primórdios foliares.

03 – As gemas foliares alargam e separam-se da base.

07 – As pequenas folhas exteriores abrem-se sem se separar do todo, permanecendo os extremos apicais unidos.

09 – As pequenas folhas exteriores separam-se e as pontas ficam entre-cruzadas.

Estado principal de crescimento 1: desenvolvimento das folhas

11 – As primeiras folhas separam-se do todo e têm uma cor verde acinzentada.

15 – Outras folhas se separam, mas sem alcançar o tamanho final. As primeiras folhas adquirem uma tonalidade verde nas pontas.

19 – As folhas alcançam o tamanho e a forma típica da variedade.

Estado principal de crescimento 3: desenvolvimento dos lançamentos

31 – Os lançamentos alcançam 10 % do seu tamanho final.

33 – Os lançamentos alcançam 30 % do seu tamanho final.

37 – Os lançamentos alcançam 70 % do seu tamanho final.

Estado principal de crescimento 5: desenvolvimento das inflorescências

50 – As gemas florais, situadas nas axilas das folhas, estão completamente fechadas e são pontiagudas, sem pedúnculo e com brácteas de cor ocre.

51 – As gemas florais começam a inchar e separam-se da base mediante um pedúnculo.

53 – As gemas florais abrem e começa o desenvolvimento do rácimo floral.

Anexos

98

54 – Os verticilos do rácimo floral começam a alargar-se.

55 – Rácimo floral totalmente expandido e os botões florais começam a abrir.

57 – A corola, de cor verde, é maior que o cálice.

59 – A corola muda de cor verde para branco.

Estado principal de crescimento 6: floração

60 – Abertura das primeiras flores.

61 – Começo da floração: cerca de 10 % das flores estão abertas.

65 – Plena floração: pelo menos 50 % das flores estão abertas.

67 – As pétalas brancas começam a cair.

68 – A maioria das pétalas caiu ou estão manchadas.

69 – Fim da floração, vingamento dos frutos e abscisão dos ovários não fecundados.

Estado principal de crescimento 7: desenvolvimento dos frutos

71 – Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final.

75 – Frutos com aproximadamente 50 % do seu tamanho final. Inicia-se o endurecimento do endocarpo (o fruto apresenta resistência ao corte).

79 – Frutos com aproximadamente 90 % do seu tamanho final e estão aptos para a colheita em verde.

Estado principal de crescimento 8: Maturação dos frutos

80 – O verde intenso dos frutos muda para verde claro ou amarelado.

81 – Começa a coloração dos frutos.

85 – Aumenta a coloração específica dos frutos.

89 – Os frutos adquirem a cor específica da variedade, permanecendo túrgidos e estão aptos para a extração de azeite.

Estado principal de crescimento 9: Senescência

92 – Os frutos perdem a turgescência e começam a cair.

